

Криотропное гелеобразование водных растворов поливинилового спирта и биотехнологические аспекты применения формируемых в результате этого макропористых полимерных материалов

В.И. ЛОЗИНСКИЙ, Л.Г. ДАМШКАЛН, Е.А. ПОДОРОЖКО, Б.Л. ШАСКОЛЬСКИЙ

Институт элементоорганических соединений им. А.Н.Несмеянова РАН, г. Москва

Cryotropic Gelation of Aqueous Solutions of Polyvinyl Alcohol and Biotechnological Aspects of Application of Resulted Formed Macroporous Polymer Materials

V.I. LOZINSKY, L.G. DAMSHKALN, E.A. PODOROZHKO, B.L. SHASKOLSKY

A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Криогели поливинилового спирта (ПВС) образуются в результате криогенной обработки концентрированных растворов данного полимера. Свойства и структура криогелей ПВС (КГПВС) определяются такими факторами, как характеристики полимерного гелеобразователя, его концентрация в исходном растворе, температурные режимы криоструктурирования. Принципиальной особенностью КГПВС является макропористая гетерофазная морфология. Размеры и «архитектура» таких пор имеют существенное значение для интегральных свойств КГПВС. В настоящее время эти гелевые материалы привлекают большое внимание в плане их использования для практических целей, особенно в таких областях, как биотехнология и разработка материалов биомедицинского назначения.

Поскольку для успешного применения КГПВС необходимо четко представлять, как характеристики самого гелеобразователя (т. е. ПВС), условия криогенного процесса влияют на комплекс физико-химических и эксплуатационных показателей гелевой матрицы и на ее пористую морфологию, нами были выполнены исследования, результаты которых послужили основой для выбора криогелей ПВС, обладающих набором свойств, которые наиболее полно отвечают области их применения. На основе КГПВС были разработаны следующие системы биотехнологического предназначения: носители иммобилизованных ферментов (как для ковалентной фиксации белковых молекул, так и композитных биокатализаторов, в которых нерастворимая форма фермента включена в объем криогеля в качестве дисперсного наполнителя); носители иммобилизованных клеток микроорганизмов, макропористые иммуноаффинные сорбенты; гелевые основы плотных питательных сред; «защищенные» ионообменные смолы и др. Наиболее предпочтительной формой частиц различных носителей являются сферические гранулы, поэтому была создана специальная криогрануляционная установка, позволяющая получать гранулированные криогели ПВС размером от ~0,2 до 3–4 мм с достаточно узким распределением размеров частиц.

Показано, что криогели ПВС являются перспективными носителями для иммобилизации молекул и клеток. Макропористая структура КГПВС обеспечивает незатрудненный массоперенос субстратов и продуктов/метаболитов к и от биологически активного действующего начала (лиганды, ферменты, клетки). Химическая структура ПВС дает возможность с помощью достаточно простых превращений вводить различные функциональные группировки на носитель. КГПВС обладают высокими прочностными характеристиками, а матрица носителя является упруговязким нехрупким материалом, не подвергаемом абразивному износу, даже при интенсивном перемешивании. КГПВС имеют термостабильность, достаточную для функционирования иммобилизованных термостабильных ферментов и термофильных штаммов микроорганизмов. Криогели ПВС обладают высокой химической и биологической стойкостью, а гелеобразователь – ПВС – биосовместимый нетоксичный, доступный и недорогой полимер, который может использоваться повторно после инактивации биологических компонентов.

Работа поддержана грантами РФФИ № 12-03-00216_a и 12-08-00058_a.

Cryogels of polyvinyl alcohol (PVA) are formed as a result of cryogenic processing of the concentrated solutions of polymer. Properties and structure of PVA cryogels (PVSCGs) are determined by the factors such as characteristics of the polymer gel former, its concentration in the initial solution, temperature regimens of cryostructuring. The principal feature of PVSCGs is macroporous heterophase morphology. Dimensions and 'architecture' of such pores are essential for the integral properties of PVSCGs. Nowadays these gel materials due to their high porosity and excellent mechanical properties attract a lot of attention in their use for practical purposes, especially in such areas as biotechnology and the development of materials for biomedical applications.

As for the successful use of PVSCGs it must be clear how the characteristics of the gelling agent (*i.e.* PVA), the conditions of the cryogenic process affect the complex of physico-chemical and performance parameters of the matrix and its porous morphology, we have carried out the investigations the results of which served the base for selection of PVA cryogels with properties that best correspond their field of application. The systems following biotechnological purposes based on PVSCGs have been developed, they are the carriers of immobilized enzymes (for covalent fixation of protein molecules and composite biocatalysts where the insoluble form of enzyme is included in the scope of cryogel as disperse filler); carriers of microorganisms' immobilized cells, macroporous immunoaffinity sorbents; gel bases of solid nutrient media, 'protected' ion exchange resins, *etc.* The most preferred form of particles of different carriers are spherical granules, therefore there was developed a special cryogranulating set-up allowing to obtain granulated PVA cryogels with size of from ~0.2 to 3–4 mm with rather narrow distribution of particle sizes.

It has been shown that PVA cryogels are prospective carriers for immobilization of molecules and cells. Macroporous structure of PVSCGs provides unhindered mass transfer of substrates and products / metabolites to and from the biologically active effective agents (ligands, enzymes, cells). The chemical structure of PVA enables with quite simple transformations to introduce various functional groups to the carrier. PVSCGs have high strength characteristics, and the matrix of the carrier is viscoelastic non-fragile material, not exposed to the abrasion even during intensive stirring. PVSCGs have thermal stability sufficient for the functioning of immobilized thermostable enzymes and thermophilic strains of microorganisms. PVA cryogels have high chemical and biological stability, gelling agent PVS is biocompatible, non-toxic, available and inexpensive polymer that can be re-used after inactivation of biological components.

This work was supported by grants of Russian Foundation for Basic Research Nr: 12-03-00216_a and 12-08-00058_a.

Влияние ряда криопротекторов на механизмы роста внеклеточных кристаллов льда

Л.Г. КУЛЕШОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Influence of Several Cryoprotectants on Mechanisms of Extracellular Ice Crystal Growth

L.G. KULESHOVA

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

Как показали проведенные нами ранее криомикроскопические исследования в зависимости от режима охлаждения и состава внеклеточной среды в суспензии, а также в результате фазового перехода в ней формируется внеклеточный лед различной морфологии. При этом сохранность замороженных клеток зависит от формы и размера внеклеточных кристаллов, поскольку структура внеклеточного льда оказывает влияние на характер массообмена между клетками и окружающей их средой. В свою очередь, формирующаяся при замораживании морфологическая структура льда определяется механизмом ее роста. Отличительным признаком известных механизмов роста кристаллов является различная зависимость линейной скорости роста грани кристалла v от переохлаждения системы ΔT .

В работе линейная скорость роста кристаллов льда как функция переохлаждения изучена на модели внеклеточной среды, который представляет собой раствор лиофилизированной плазмы крови человека, содержащий криопротекторы ЭГ, ДМСО, ПЭГ м.м. 1500 и ПВП м.м. 12000. Установлено, что независимо от вида криопротектора, его концентрации и величины переохлаждения внеклеточного раствора аналитическая зависимость линейной скорости роста кристаллов льда преимущественно представлена двумя слагаемыми. Это указывает на реализацию в системе одновременно двух механизмов роста: нормального ($v \sim \Delta T$) и дислокационного ($v \sim \Delta T^2$). Увеличение концентрации криопротектора в растворе приводит к ингибированию как нормальной, так и дислокационной составляющих роста. При этом дислокационная составляющая более чувствительна к наличию криопротекторов в растворе, чем нормальная. По степени ингибирования нормальной составляющей роста криопротекторы располагаются в ряд ЭГ > ПЭГ-1500 > ДМСО > ПВП-12000, а дислокационной составляющей – в ряд ЭГ > ДМСО > ПВП-12000 > ПЭГ-1500. Оценены величины критических переохлаждений ΔT_c , при которых вклад в линейную скорость роста кристаллов льда обоих механизмов одинаков, и определены те области переохлаждений, где превалирует один из них. Преобладание того или иного механизма формирования внеклеточной морфологической структуры льда оказывает влияние на сохранность биологических объектов. Поскольку при дислокационном механизме линейная скорость роста кристаллов льда больше, чем при нормальном, быстрое увеличение градиента осмотического давления на мембране, обусловленное вымораживанием внеклеточной воды, может привести к гибели клетки уже в температурной зоне формирования первичной кристаллической структуры. Отсюда следует целесообразность максимального ингибирования этой составляющей роста, что, как установлено, наиболее эффективно достигается при содержании во внеклеточной среде ЭГ.

As cryomicroscopic investigations which were carried out by us showed, depending on a mode of cooling and structure of extracellular environment in suspension, and also as a result of phase transition in it extracellular ice of various morphology was formed. Moreover the survival of frozen-thawed cells depends on a form and size of extracellular crystals as the structure of extracellular ice influences the character of mass transfer between cells and environment. In its turn, the morphological structure of ice which was formed during freezing was determined by the mechanism of its growth. The distinctive feature of the known mechanisms of growth of crystals is various dependence of linear growth rate of a crystal face v from system supercooling ΔT .

In the research a linear growth rate of ice crystals as the function of supercooling is studied in the model of extracellular environment, which represents the solution of lyophilized human blood, containing cryoprotectants EG, DMSO, PEG m.w. 1500 and PVP m.w. 12000. It is established that irrespective of cryoprotectant type, its concentration and value of extracellular solution supercooling, analytical dependence of linear growth rate of ice crystals is mainly presented by two components. It indicates the realization in the system of two mechanisms of growth simultaneously: normal ($v \sim \Delta T$) and dislocational ($v \sim \Delta T^2$). The increase in concentration of cryoprotectant in solution leads to inhibition of both normal and dislocational growth components. Thus the dislocational component is more sensitive to existence of cryoprotectant in solution, than normal one. By degree of inhibition of normal growth component, cryoprotectants are in a row EG > PEG-1500 > DMSO > PVP-12000 and dislocational component in a row EG > DMSO > PVP-12000 > PEG-1500. The values of critical supercoolings ΔT_c at which the contribution to linear growth rate of ice crystals of both mechanisms is identical are estimated and the areas of supercoolings where one of them prevails are found. Prevalence of this or that mechanism of formation of extracellular morphological ice structure influences the safety of biological objects. As at the dislocational mechanism a linear growth rate of ice crystals is more than at normal one, the fast increase of osmotic pressure gradient on a membrane caused by freezing-out of extracellular water, can cause the death of a cell even in temperature zone of primary crystal structure formation. Herewith the expediency of maximum inhibition of this growth component, as it was established, is most effectively achieved, when an extracellular environment contains EG.

Механізми проникання гліцерину крізь мембрани еритроцитів людини

О.І. ГОРДІЄНКО, С.Є. КОВАЛЕНКО, І.Ф. КОВАЛЕНКО

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Mechanisms of Glycerol Penetration Through Membranes of Human Erythrocytes

O.I. GORDIYENKO, S.YE. KOVALENKO, I.F. KOVALENKO

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

Механізми проникання гліцерину крізь мембрани еритроцитів людини є наразі дискусійним питанням. Гліцерин – найбільш гідрофільний з відомих криопротекторів. Коефіцієнт його розподілу між гідрофобною фазою та водою становить 0,005, що на порядок менше, ніж 1,2-пропандіолу (0,076). Тому його проникання крізь ліпідний бішар вкрай утруднено. Але було показано, що обробка еритроцитів сульфгідрильним реагентом pCMBS, що є блокатором білкових каналів, не впливає на їх проникність до гліцерину, і зроблено висновок, що гліцерин проникає в еритроцити ліпідним шляхом. В той же час в інших роботах показано, що в мембранах еритроцитів людини існують гліцеринові канали, утворені каналотворюючим білком AQP3, і гліцерин, який на думку авторів, проникає в ці клітини по специфічним каналам.

Енергія активації – одна з найважливіших характеристик транспортних процесів. Аргументом на користь проникання молекул крізь плазматичні мембрани за тим чи іншим механізмом є значення видимої енергії активації цього процесу. На практиці чисельну величину енергії активації (E_a) визначають з нахилу графіка $\ln k$ від $1/T$ згідно з рівнянням Ареніуса. Прониканню речовин за каналним механізмом відповідає значення енергії активації в діапазоні 15–25 кДж/моль, яке узгоджується зі значеннями енергії активації дифузії в об'ємному розчині. При прониканні молекул шляхом розчинення і дифузії в ліпідному матриксі енергія активації має значення 30–85 кДж/моль і більше.

Для визначення механізмів проникання гліцерину в еритроцити людини нами була досліджена температурна залежність проникності мембран еритроцитів для молекул цієї речовини в діапазоні температур 37...4°C. Коефіцієнти проникності визначали з часових залежностей гемолізу еритроцитів у водних розчинах гліцерину, отриманих методом малокутового розсіювання світла.

У результаті апроксимації експериментальних точок в координатах Ареніуса були отримані значення енергії активації проникання гліцерину крізь мембрани еритроцитів людини: 76 ± 13 кДж/моль в діапазоні температур 37...16°C та $159 \pm 15,6$ кДж/моль в діапазоні 12...4°C. Отримані у нашому дослідженні значення енергії активації характерні для ліпідного шляху. В той же час вони практично співпадають з такими при використанні 1,2-пропандіолу для оброблених блокатором білкових каналів еритроцитів (тобто для проникання 1,2-пропандіолу крізь ліпідний бішар), хоча для такої надзвичайно гідрофільної речовини, як гліцерин, можна було б очікувати ще більших значень енергії активації.

Таким чином, питання про механізми проникання гліцерину в еритроцити людини потребує подальшого вивчення.

Nowadays the question about mechanisms of glycerol penetration through the membranes of human erythrocytes is debatable. Glycerol is the most hydrophilic known cryoprotectant. Its distribution coefficient between the hydrophobic phase and water is 0.005, which is far less than 1,2-propanediol coefficient (0.076). Therefore, its penetration through the lipid bilayer is extremely difficult. But there was shown that treatment of erythrocyte sulfhydryl reagent pCMBS, being a blocker of protein channels, did not affect their permeability to glycerol and concluded that glycerol penetrated into erythrocytes with lipids. At the same time, other researches show that in human erythrocyte membranes there are glycerol channels formed by channel-forming protein AQP3, and glycerol penetrates into these cells through specific channels.

Activation energy is one of the most important characteristics of transport processes. The value of visible activation energy of this process is an argument in favor of molecules penetration through the plasmatic membranes with one or another mechanism. In practice, the numerical value of activation energy (E_a) is determined by curve slope $\ln k$ from $1/T$ according to Arrhenius equation. Penetration of substances with channel mechanism corresponds the activation energy value within the range of 15–25 kJ/mol, agreed with activation energy values of diffusion in bulk solution. Activation energy during penetration of molecules by dissolution and diffusion has a value 30–85 kJ/mol or higher in lipid matrix.

To establish the mechanisms of glycerol penetration in human erythrocytes we investigated the temperature dependence of erythrocyte membrane permeability for molecules of this substance within the temperature range of 37...4°C. Permeability coefficients were established with time-dependent hemolysis of erythrocytes in glycerol aqueous solutions, obtained by small-angle light scattering.

As a result of approximation of experimental points in Arrhenius coordinates there were obtained activation energy values of glycerol penetration through the membranes of human erythrocytes. It was 76 ± 13 kJ/mol within the range 37...16°C and 159 ± 15.6 kJ/mol in 12–4°C. The activation energy values obtained in our study are characteristic for lipids. At the same time, they practically coincide with those using 1,2-propanediol for channel blocker of erythrocytes treated with protein (*i. e.* for penetration of 1,2-propanediol through the lipid bilayer), although we would expect higher values of activation energy of an extremely hydrophilic substance as glycerol.

Thus, the question about the mechanisms of glycerol penetration into human erythrocytes requires the further study.

Калориметрическое исследование термоденатурации гемоглобина в присутствии криопротекторов

Ю.С. ГОВОРОВА, А.В. ЗИНЧЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Calorimetric Investigation of Hemoglobin Thermodenaturation with Cryoprotectants

Yu.S. GOVOROVA, A.V. ZINCHENKO

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

Термодинамические характеристики процесса тепловой денатурации белков под влиянием различных физико-химических факторов позволяют судить о конформационных изменениях молекул. Так, состав среды и температура играют существенную роль в поддержании нативной конформации макромолекул. Эти факторы являются важными в криобиологии при разработке технологий консервирования низкими температурами биологических систем в присутствии криозащитных сред.

В настоящей работе методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) проведено исследование влияния глицерина, 1,2-пропандиола (1,2-ПД), диметилсульфоксида (ДМСО) и оксиэтилированного глицерина со степенью полимеризации $n = 5$ ($OEG_{n=5}$) на термодинамические и кинетические параметры термоденатурации гемоглобина человека и некоторых сельскохозяйственных животных на основе анализа ДСК термограмм.

Гемоглобин получали из крови человека, лошади и быка по известной методике. Концентрация гемоглобина, определенная методом спектрофотометрии, составляла 5 мМоль. Термограммы регистрировали на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре ДАСМ-4. Область сканирования – от 25 до 90°C. Скорость нагрева – 1 град/мин.

Нами рассчитаны значения калориметрической энтальпии, энергии активации и температуры термоденатурации гемоглобина с добавлением различных концентраций глицерина, 1,2-ПД, ДМСО и $OEG_{n=5}$. Расчетные значения энергии активации значительно превышают значения калориметрической энтальпии термоденатурации гемоглобина. Построены зависимости калориметрической энтальпии и температуры денатурации гемоглобина от концентрации глицерина, 1,2-ПД, ДМСО и $OEG_{n=5}$. Показано, что используемые криопротекторы приводят к снижению температуры и сложному поведению калориметрической энтальпии термоденатурации гемоглобина с ростом концентрации криопротектора в растворе. Эти факты указывают на то, что $OEG_{n=5}$, 1,2-ПД и ДМСО способствуют разрыхлению молекул гемоглобина человека, быка и лошади, а также понижению термостабильности белка. Исключение составляет глицерин, который не вызывает существенного отклонения температуры денатурации гемоглобина в пределах концентрации глицерина 0–40 масс. %.

Таким образом, глицерин, являясь химическим шапероном, способствует сохранению термостабильности гемоглобина, т. е. стабилизирует белки неспецифически к структуре макромолекул в их совместных комплексах, образующихся за счет слабых взаимодействий (гидрофобных, Ван-дер-ваальсовых, водородных связей). Степень подобного воздействия зависит от строения молекулы гемоглобина.

Thermodynamic characteristics of thermal denaturation of proteins under the effect of various physical and chemical factors allow to estimate the conformational changes of molecules. Thus, medium composition and temperature play an important role in maintaining native conformation of macromolecules. These factors are important for cryobiology in development of low temperature preservation technologies of biological systems with cryoprotective media.

In the present work there was performed by differential scanning calorimetry (DSC) the study of glycerol, 1,2-propanediol (1,2-PD), dimethyl sulfoxide (DMSO) and oxyethylated glycerol with the polymerization degree $n = 5$ ($OEG_{n=5}$) effect on thermodynamic and kinetic parameters of human hemoglobin thermodenaturation, and some livestock animals on the basis of DSC thermogram analysis.

Hemoglobin was derived from human, bovine and canine blood according to the standard method. Hemoglobin concentration determined by spectrophotometry, was 5 mM. Thermograms were recorded with a differential scanning microcalorimeter DASM-4. Scan area was from 25 to 90°C. Heating rate was 1 deg/min.

We calculated the values of calorimetric enthalpy, activation energy and hemoglobin thermodenaturation temperature with the addition of various concentrations of glycerol, 1,2-PD, DMSO, and $OEG_{n=5}$. Calculated values of activation energy are significantly higher than calorimetric enthalpy ones of hemoglobin thermodenaturation. There were built the dependences of calorimetric enthalpy and hemoglobin thermodenaturation temperature on concentration of glycerol, 1,2-PD, DMSO, and $OEG_{n=5}$. It was shown that the use of cryoprotectants resulted in temperature reduction and complex behavior of calorimetric enthalpy of hemoglobin thermodenaturation with increasing cryoprotective concentration in solution. These facts suggest that the $OEG_{n=5}$, 1,2-PD and DMSO contribute to loosening of molecules of human, bovine, canine hemoglobin, as well as a decrease of protein thermal stability. Glycerol, which does not cause a significant deviation of hemoglobin denaturation temperature within the range of glycerol concentration 0-40 % w/w is an exception.

Thus, glycerol, being a chemical chaperone, enables to preserve hemoglobin thermal stability, *i. e.* nonspecifically stabilizes proteins to the structure of macromolecules in their combined complexes formed by weak interactions (hydrophobic, Van der Waals, hydrogen bonds). The rate of this effect depends on the structure of hemoglobin molecule.

Влияние снижения температуры и вида криопротектора на кристаллогенные свойства плазмы донорской крови

А.А.КОСТЯЕВ¹, А.К.МАРТУСЕВИЧ²

¹ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России»

²Нижегородский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии

Effect of Lowering the Temperature and Type of Cryoprotectant on Crystallogenic Properties of Donor's Blood Plasma

А.А.KOSTYAEV¹, А.К.MARTUSEVICH²

¹Kirov Institute of Hematology and Blood Transfusion, Kirov, Russia

²Nizhny Novgorod Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Nizhny Novgorod, Russia

Целью работы являлось исследование особенностей кристаллогенных свойств плазмы крови с учетом уровня гипотермии и вида внесенного *in vitro* в кровь водного раствора криопротектора.

Кристаллогенные свойства плазмы из донорской крови, в которую были внесены растворы криопротекторов: 1 – 5% ДМСО; 2 – 5% ДМАЦ + 5% глюкозы (раствор «Тромбокриодмац»); 3 – 5% глицерина + 4% глюкозы, оценивали *in vitro* до и после воздействия отрицательных температур. Смеси замораживали до –80 или –196°C с последующим отогревом на водяной бане при 38°C. Инкубирование крови проводили в термостате при 37°C в течение 4 и 24 ч. Кристаллизацию сформированных биосистем исследовали путем качественного и количественного анализа дегидратированных без термической стимуляции капель плазмы с использованием комплекса визуаметрических параметров [Мартусевич А.К., Гришина А.А., 2009].

Установлено, что по степени выявленных признаков деструкции биосистемы с криопротекторами, выдержанными при 22 ± 2°C, следуют: 5% ДМСО > 5% ДМАЦ + 5% глюкозы > 5% глицерина + 4% глюкозы.

В серии опытов с использованием «Тромбокриодмац», подвергнутого замораживанию до –196°C, кристаллогенные свойства плазмы развивались в более благоприятном направлении по сравнению с биосубстратом, который содержал тот же гемоконсервант, но замороженный до –80°C. Данная тенденция прослеживалась через 4 и 24 ч инкубации крови в термостате.

Добавка 5%-го раствора ДМСО во всех биопробах демонстрировала большую сохранность физиологической картины структуризации плазмы, чем ДМАЦ + 5% глюкозы или 5% глицерина + 4% глюкозы. Внесение в кровь криопротекторов, подвергнутых замораживанию до –80°C, способствовало более быстрому развитию процессов структуризации в плазме, чем при внесении образцов тех же растворов, замороженных до –196°C. Сохранность кристаллогенных свойств сформированной системы «плазма крови – криопротектор» была выше при использовании препаратов после замораживания до –196°C.

Таким образом, среди испытанных криопротекторов наиболее физиологичным по кристаллогенным свойствам системы «плазма крови – криопротектор» является 5% раствор ДМСО, а наиболее предпочтительным – режим замораживания при –196°C.

The research aim was to study the crystallogenic properties of plasma according to hypothermia level and type of aqueous cryoprotectant, introduced into blood *in vitro*.

Crystallogenic properties of plasma from donor's blood, wherein cryoprotective solutions were introduced: 1 – 5% DMSO, and 2 – 5% DMAC + 5% glucose (Thrombocryodmac solution), and 3 – 5% glycerol + 4% glucose were evaluated *in vitro* prior to and after the exposure to freezing temperatures. The mixture was frozen at –80 and –196°C, followed by warming on water bath at 38°C. Blood was incubated in an incubator at 37°C for 4 and 24 hrs. Crystallization of the formed biosystems was investigated by qualitative and quantitative analysis of dehydrated without thermal stimulation drops of plasma using the complex of visumetry methods [Martusevich A.K., Grishin A.A., 2009].

It has been found that according the destructive effect on biosystem with cryoprotectants at 22 ± 2°C the studied solutions made the following row 5% DMSO > 5% DMAC + 5% glucose > 5% glycerol + 4% glucose.

In the series of experiments with Thrombocryodmac subjected to freezing down to –196°C, crystallogenic plasma properties developed in more favorable direction if compared to biological substrate, which contained the same hemopreservative but frozen down to –80°C. This tendency was observed after 4 and 24 hrs of blood incubation in the thermostat.

The addition of 5% DMSO solution in all the bioassays showed higher preservation of physiological picture of plasma structuring than DMAC + 5% glucose or 5% glycerol + 4% glucose. Introduction in to the blood of cryoprotectants subjected to freezing down to –80°C, promoted the development of more rapid structuring processes in plasma than when introducing the samples of the same solutions, frozen down to –196°C. Preservation of crystallogenic properties of the 'blood plasma – cryoprotectant' system was higher using the solutions after freezing down to –196 °C.

Thus, among the tested cryoprotectants the most physiological from the point of view of crystallogenic properties of the 'blood plasma – cryoprotectant' system was 5% DMSO solution, and the most preferred freezing protocol was at –196°C.

Кластерная кристаллизация водных растворов ПЭО-1500

Е.В. ДАВЫДОВА, А.И. ОСЕЦКИЙ, В.И. РЕЗНИКОВ, С.С. СЕВАСТЬЯНОВ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cluster Crystallization of PEO-1500 Aqueous Solutions

E.V. DAVYDOVA, A.I. OSETSKY, V.I. REZNIKOV, S.S. SEVASTYANOV
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Изучение процессов кристаллизации водных растворов криопротекторных веществ – одно из важнейших направлений современной криобиологии, так как с ними связывают основные механизмы повреждения криоконсервируемых биообъектов [B.J. Fuller и др., 2004]. Однако общие закономерности этих процессов не сформулированы до сих пор. Это наглядно проявляется и при изучении явления кластерной кристаллизации [A.I. Osetsky, 2011].

Введение кластерной фазы позволяет построить полные диаграммы состояний криопротекторных растворов и понять природу экспериментально наблюдаемых при их отогреве от температуры стеклования T_g , но не находящихся объяснения в рамках модели эвтектической кристаллизации эффектов: дополнительную кристаллизацию и два последующих пика плавления. В то же время все особенности образования новой кластерной фазы требуют дополнительных исследований.

При изучении кластерной кристаллизации водных растворов глицерина высказано предположение, что ей предшествует процесс образования трехмерных ассоциатов из гидратированных молекул криопротекторного вещества [Е.В. Давыдова, А.И. Осецкий, 2011]. Однако анализ показывает, что в силу влияния энтропийного фактора такие ассоциаты в растворах глицерина становятся устойчивыми при температурах $T > T_g$, что исключает кластерную кристаллизацию на этапе охлаждения. Исследования проводили с учетом того, что при переходе от глицерина к ПЭО-1500 влияние энтропийного слагаемого в выражении для свободной энергии системы ослабевает и процессы образования устойчивых ассоциатов и кластерной кристаллизации могут наблюдаться при более высоких температурах. В настоящей работе с помощью метода объемной сканирующей тензодилатометрии кластерная кристаллизация впервые зафиксирована на этапе охлаждения раствора в интервале температур $-50 \dots -70^\circ\text{C}$, что может служить дополнительным подтверждением как эффекта кластерной кристаллизации, так и гипотезы двухступенчатой природы этого явления.

The study of crystallization processes of cryoprotective substances' aqueous solutions is one of the most important directions of contemporary cryobiology, since the main mechanisms of injury of the biological objects under cryopreservation are related to them [B.J. Fuller et al., 2004]. However, general regularities of these processes have not been specified yet. This is vividly manifested when studying the phenomenon of cluster crystallization [A.I. Osetsky, 2009].

Introduction of cluster phase enables the building of complete diagrams of the states of cryoprotective solutions and understand the nature of experimentally observed at their thawing from vitrification temperature T_g , but not having the explanation within the frames of the model of eutectic crystallization effects: additional crystallization and two following peaks of melting. At the same time all peculiarities of the formation of new cluster phase require additional studies.

When investigating the cluster crystallization of glycerol aqueous solutions there was supposed that it was preceded by the formation of 3D associates of cryoprotective substance hydrated molecules [E.V. Davydova, A.I. Osetsky, 2011]. However, the analysis shows that due to entropia factor these associates in glycerol solutions become resistant at temperatures $T > T_g$, that excludes cluster crystallization at cooling stage. The studies were performed taking into account the fact that during transition from glycerol to PEO-1500 the effect of entropia summand in the expression for the system free energy weakens and the processes of formation of resistant associates and cluster crystallization can be observed at higher temperatures. In this work by means of volumetric scanning tensodilatometry the cluster crystallization was for the first time found at solution cooling stage within temperature interval $-50 \dots -70^\circ\text{C}$, which may serve as additional evidence of both the effect of cluster crystallization and the hypothesis of two-step nature of this phenomenon.

Изменение механической стабильности эритроцитов человека в присутствии криопротекторов: роль ионной силы среды и кальция

Н.Г. ЗЕМЛЯНСКИХ, Д.И. АЛЕКСАНДРОВА, Л.А. БАБИЙЧУК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Change of Human Erythrocyte Mechanical Stability in Presence of Cryoprotectants: Role of Ionic Strength and Calcium

N.G. ZEMLYANSKIKH, D.I. ALEXANDROVA, L.A. BABIYCHUK

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

Выживаемость эритроцитов в процессе замораживания-отогрева в присутствии криопротекторов может быть связана как с изменением характера кристаллизации жидкой фазы, так и с возможностью модификации структурных свойств и функциональной активности компонентов клетки. Для эритроцитов структурный и функциональный ответ на воздействие криопротекторов связан, прежде всего, с реорганизацией плазматической мембраны. Механическая стабильность эритроцитов – одна из наиболее важных функциональных характеристик, которая определяется структурными свойствами липидного бислоя и состоянием белков мембрано-цитоскелетного комплекса.

Цель данного исследования – изучение влияния ряда химических соединений, обладающих криопротекторными свойствами, на устойчивость эритроцитов человека при механическом стрессе; оценка модифицирующей роли электролитов и ионов кальция, присутствующих во внеклеточной среде, на состояние клеток в данных условиях.

Механическую чувствительность оценивали по уровню гемолиза клеточных суспензий в средах, содержащих различные концентрации NaCl, глицерола, маннитола, сахарозы, ПЭГ-1500 и декстрана м.м. 40000.

Полученные результаты показали, что при механическом стрессе гипертонические концентрации NaCl и маннитола дестабилизировали клетки, а сахароза, декстран, глицерол и ПЭГ понижали уровень гемолиза относительно контроля. Максимальную эффективность в стабилизации эритроцитов проявляли глицерол и ПЭГ (5–15%). Уровень гемолиза во всех средах, не содержащих NaCl, существенно возрастал по отношению к гемолизу в аналогичных растворах с включением 150 мМ NaCl, что может быть вызвано изменением мембранного потенциала. Введение Ca²⁺ и ЭДТА в раствор ПЭГ повышало гемолиз практически в 2 раза по сравнению с исходным раствором. В глицерол-содержащей среде ЭДТА вызывал сходную реакцию, однако Ca²⁺ не оказывал значимого влияния. Эффект ЭДТА на эритроциты, очевидно, связан с его влиянием на мембраносвязанный Ca²⁺, что негативно отражается на структуре мембранных компонентов. Влияние Ca²⁺ в ПЭГ- и глицерол-содержащих растворах на механическую стабильность эритроцитов может быть обусловлено различным состоянием систем, регулирующих уровень Ca²⁺ в клетках в присутствии данных веществ.

Таким образом, криопротекторные соединения могут повышать механическую устойчивость эритроцитов, что указывает на их способность стабилизировать эритроциты к различным типам стрессовых воздействий на основе неких общих принципов или на возможность того, что механическая стабилизация является составным элементом криозащиты клеток.

Survival of erythrocytes during freeze-thawing in the presence of cryoprotectants can be associated with the change in the liquid phase crystallization character and with the possibility of modifying the structural properties and functional activity of cell components. For erythrocytes a structural and functional response to the cryoprotectant is primarily associated with the reorganization of plasma membrane. Mechanical stability of red blood cells is one of the most important functional characteristics, which is determined by structural properties of lipid bilayer and the state of the proteins of membrane-cytoskeletal complex.

The research aim was to study the effect of a number of chemical compounds with cryoprotective properties on the resistance of human erythrocytes to a mechanical stress, evaluation of a modifying role of electrolytes and calcium ions present in extracellular environment, on the state of cells under these conditions.

Mechanical sensitivity was assessed by the level of cell suspension hemolysis in media containing different concentrations of NaCl, glycerol, mannitol, sucrose, PEG-1500 and dextran with 40,000 m.m.

The obtained results showed that during mechanical stress hypertonic concentrations of NaCl and mannitol destabilized the cells, and sucrose, dextran, glycerol and PEG reduced the level of hemolysis compared with the control. Glycerol and PEG (5–15%) showed a maximum efficiency in erythrocyte stabilization. Level of hemolysis in all the media not containing NaCl significantly increased if compared to hemolysis in similar solutions with the inclusion of 150 mM NaCl, which may be caused by the change of membrane potential. Introduction of Ca²⁺ and EDTA in PEG solution increased the hemolysis twice if compared to the initial solution. In the glycerol-containing medium EDTA induced similar reactions, but Ca²⁺ did not affect significantly. Effect of EDTA on erythrocytes is obviously related to its effect on membrane-bound Ca²⁺, which negatively affects the structure of membrane components. Effect of Ca²⁺ in PEG and glycerol-containing solutions on the mechanical stability of red blood cells may be stipulated by different states of the systems regulating the level of Ca²⁺ in cells in the presence of these substances.

Thus, cryoprotective compounds can increase the mechanical stability of erythrocytes indicating their ability to stabilize the erythrocytes to different types of stress on the basis of some general principles or to the possibility that mechanical stabilization is an element of cell cryoprotection.

Исследование криопротекторных и физико-химических свойств сред на основе оксиэтилированного метилцеллозоля

А.В. НИКОЛЕНКО, О.В. ВЯЗОВСКАЯ, В.В. ЧЕКАНОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Study of Cryoprotective and Physicochemical Properties of Media Based on Oxyethylated Methyl Cellosolve

A.V. NIKOLENKO, O.V. VYAZOVSKAYA, V.V. CHEKANOVA

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

Проведено комплексное исследование криопротекторных и физико-химических свойств композиционных сред на основе оксиэтилированного метилцеллозоля (ОЭМЦ). В качестве криозащитных сред использовали 20 и 30% ОЭМЦ, приготовленные на 50 и 150 мМ растворах NaCl, 20% ОЭМЦ – на 100 мМ NaCl с добавлением 90 мМ сахарозы, 20% ОЭМЦ – на 50 мМ NaCl с 200 мМ глюкозой, 20% ОЭМЦ – на 50 мМ NaCl с 200 мМ маннитом. Криопротекторные свойства сред оценивались по комплексу показателей, характеризующих сохранность эритроцитов: гемолизу, осмотической хрупкости, внутриклеточному содержанию калия и натрия. Определяли физико-химические свойства сред: осмотичность, ионную силу, динамическую вязкость, поверхностное натяжение, плотность, температуру заморозки.

Установлено, что сохранность криоконсервированных эритроцитов зависит от состава криозащитных сред и их физико-химических свойств. Введение углеводов в криозащитные среды на основе 20% ОЭМЦ приводит к повышению показателей плотности, вязкости, поверхностного натяжения относительно показателей, полученных для среды с 20% ОЭМЦ на 50 мМ NaCl. При этом температура заморозки сред меняется от $-2,80$ до $-4,30^{\circ}\text{C}$. В присутствии углеводов при использовании сред с 20%-й концентрацией ОЭМЦ наблюдается наиболее высокая сохранность эритроцитов по показателям осмотической хрупкости внутриклеточному содержанию калия и натрия и составляет в среднем 85%. С увеличением концентрации ОЭМЦ с 20 до 30% в присутствии 150 мМ NaCl на фоне повышения вязкости, плотности и понижения температуры заморозки среды наблюдается уменьшение величины поверхностного натяжения. Снижение поверхностного натяжения может приводить к менее выраженному контакту среды с клетками и, как следствие, уменьшению ее криозащитного действия. На фоне 1–1,5%-го гемолиза эритроцитов после замораживания с 30% ОЭМЦ на 150 мМ NaCl отмечаются самые высокие значения осмотической хрупкости, в среднем 45%. Эритроциты после замораживания с криозащитными средами на основе 20% концентрации ОЭМЦ в 1,5–2 раза более устойчивы к осмотическому шоку, чем клетки после замораживания с 30%-й концентрацией ОЭМЦ. При этом снижение содержания соли ниже физиологического уровня в средах с 20 и 30% ОЭМЦ повышает криоустойчивость эритроцитов, что может быть обусловлено точностью и ионной силой используемых криозащитных сред.

Выявлено многофакторное влияние исследованных физико-химических свойств криозащитных сред на структурно-функциональное состояние эритроцитов до и после замораживания. При разработке композиционных криозащитных сред необходимо учитывать концентрационное соотношение компонентов среды (электролит/неэлектролит) и их физико-химические свойства. Присутствие углеводов в композиционных средах в определенных соотношениях с NaCl повышает эффективность криоконсервирования эритроцитов.

Investigation of cryoprotective and physicochemical properties of compositional media at the base of oxyethylated methyl cellosolve (OEMC) has been performed. As the cryoprotective media we used 20 and 30% OEMC prepared on the base of 50 and 150 mM solutions of NaCl, 20% OEMC on 100 mM NaCl supplemented with 90 mM sucrose, 20% OEMC on 50 mM NaCl with 200 mM glucose, 20% OEMC on 50 mM NaCl with 200 mM mannitol. Cryoprotective properties of the media were evaluated by the complex of indices characterizing erythrocyte survival: hemolysis, osmotic fragility, intracellular content of potassium and sodium. We determined physicochemical properties of the media: osmotical density, ionic strength, viscosity, surface strain, density, freezing temperature.

We have established that cryopreserved erythrocyte survival depends on the content of cryoprotective media and their physicochemical properties. Introduction of carbohydrates in cryoprotective media based on 20% OEMC induces increasing the indices of density, viscosity, surface strain in relation to the indices obtained for medium based on 20% OEMC with 50 mM NaCl. Moreover freezing temperature of the media changes from $-2,80^{\circ}\text{C}$ down to $-4,30^{\circ}\text{C}$. In the presence of carbohydrates using the media with 20% OEMC we observed the highest erythrocyte survival by the indices of osmotic fragility and intracellular content of potassium and sodium and it made 85% at average. Increasing OEMC concentration from 20 up to 30% in the presence of 150 mM NaCl on the background of increasing viscosity, density and decreasing freezing temperature of the medium we noted decreasing surface strain. Decreasing surface strain may lead to less expressed contact of the medium with cells and consequently decrease of their cryoprotective effect. The highest indices of osmotic fragility (45% in average) are noted on the background of 1–1.5% erythrocyte hemolysis after freezing with 30% OEMC with 150 mM NaCl. Erythrocytes after freezing with cryoprotective media based on 20% OEMC are by half or twice more resistant to the osmotic shock than the cells after freezing with 30% OEMC. Furthermore the decrease of saline content lower than physiological level in media with 20 and 30% OEMC increases erythrocyte cryoresistance that may be stipulated by tonicity and ionic strength of the used cryoprotective media.

We revealed multi-factor effect of the studied physicochemical properties of cryoprotective media on structure-functional state of erythrocytes prior to and after freezing. When developing the compositional cryoprotective media one should consider the concentration ratio of media components (electrolyte/non-electrolyte) and their physicochemical properties. The presence of carbohydrates in compositional media in certain ratios with NaCl rises the efficiency of erythrocyte cryopreservation.

О влиянии низких температур на биомакромолекулы

О.А. НАРДИД, Е.Д. РОЗАНОВА, М.И. ШЕТИНСКИЙ, Э.О. НАРДИД
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

On the Low Temperature Effect on Biomacromolecules

O.A. NARDID, E.D. ROZANOVA, M.I. SCHETINSKY, E.O. NARDID
*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine*

Условия, в которых находятся биомакромолекулы при криоконсервировании, могут оказывать существенное влияние на конформацию белка, так как при этом могут изменяться гидрофобные взаимодействия и водородные связи, определяющие и стабилизирующие третичную и четвертичную структуры. Нарушение межмолекулярных взаимодействий может привести к структурной реорганизации, проявляющейся в агрегации отдельных биомакромолекул. Такие изменения отдельных биомакромолекул сказываются на выполняемых ими функциях, обеспечении их устойчивости и надмолекулярной организации.

В настоящей работе изучены закономерности влияния низких температур и криопротекторов на внутри- и межмолекулярные взаимодействия белков и оценена роль этих взаимодействий в резистентности биоструктур при низкотемпературном воздействии.

Динамическую структуру водно-белковой системы изучали, используя гидрофильный спиновый зонд ТЕМПОН и спин-меченую стеариновую кислоту (16-ДС). Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре «Bruker ER-100». Гель-хроматографию осуществляли на колонке 1×27 см с сефадексом G-200. Для характеристики конформации биомакромолекул использовали спектры поглощения и их первые производные, а также их спектры флуоресценции. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре «Pye Unicam SP 8000», спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре «Hitachi F-4010». Образцы по различным режимам замораживали в ампулах «Cryovial», отогревали на водяной бане при температуре 36°C.

Установлено, что изменения параметров спектров ЭПР спиновых зондов в сыворотке кордовой крови после медленного замораживания и последующего отогрева указывают на конформационные изменения белков, имеющих характер разрыхления. Показано, что медленное охлаждение приводит к агрегации белков сыворотки, основную роль в которой играют сывороточный альбумин и иммуноглобулины. Подобные процессы обнаружены в фолликулярной жидкости и экстрактах плаценты. Изучено влияние скоростей замораживания на конформацию и активность глюкозооксидазы в растворе и частично сополимеризованной с помощью глутарового альдегида. Проведенные исследования позволили определить оптимальные режимы замораживания и конечные температуры длительного низкотемпературного хранения миниатюрных электрохимических ферментных биосенсоров без существенного влияния на величину его отклика.

На основе анализа экспериментальных данных предложен механизм конформационно-структурных криоповреждений биомакромолекул. Обсуждается модуляция межмолекулярных взаимодействий низкими температурами и практическое использование полученных результатов.

The conditions, whereat the biomacromolecules are under cryopreservation, may significantly affect a protein conformation, since in this case the hydrophobic interactions and hydrogen bonds, determining and stabilizing the tertiary and quaternary structures can change as well. The disorder in intermolecular interactions may result in a structural rearrangement, manifesting in aggregation of some biomacromolecules. Such changes in some biomacromolecules affect the accomplished by them functions, provision of their resistance and supramolecular organization.

In this research there were investigated the regularities of low temperature and cryoprotectant effects on intra- and intermolecular interactions between proteins and evaluated the role of these interactions in biostructure resistance under low-temperature effect.

Dynamic structure of water-protein system was studied using the hydrophilic spin probe TEMPON and spin-labeled stearic acid (16-DS). The EPR spectra were recorded with spectrometer Bruker ER-100. Gel chromatography was performed in 1×27 cm column with Sephadex G-200. To characterize the conformation of biomacromolecules we used the absorption spectra and their first derivatives, as well as their fluorescence spectra. The spectra of absorption and fluorescence were recorded with spectrophotometer Pye Unicam SP 8000 and spectrofluorometer Hitachi F-4010, correspondingly. The samples were frozen by various regimens in cryovials, thawed in a water bath at 36°C.

The changes in parameters of spin probes EPR spectra in cord blood serum after a slow freezing and following thawing were established as indicating to conformational changes in proteins, having loosening nature. Slow cooling was shown to result in serum proteins aggregation, where the main role was played by serum albumin and immunoglobulins. The similar phenomena were found in follicular fluid and placenta extracts. The effect of freezing rates on conformation and activity of glucose oxydase in solution and partially copolymerized with glutaraldehyde was under study. The research performed enabled to determine the optimal freezing regimens and final temperatures for a long-term low temperature storage of miniature electrochemical enzyme biosensors without significant effect on its response value.

Basing on the analysis of experimental data there was suggested the mechanism of conformational and structural cryodamages of biomacromolecules. The modulation of intermolecular interactions by low temperatures and a practical use of the results obtained are discussed.

Кріоконсервування штаму перещеплених клітин нирки вівці FLK-SBBL, який продукує вірус лейкозу великої рогатої худоби

М.Ю. СТЕГНІЙ¹, Б.Т. СТЕГНІЙ¹, А.М. ГОЛЬЦЕВ²

¹ Національний технічний університет "ХПІ", м. Харків

² Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Cryopreservation of Inoculated Lamb Kidney FLK-SBBL Strain Cells, Producing Virus of Bovine Leukemia

М.Ю. STEGNIY¹, B.T. STEGNIY¹, A.M. GOLTSEV²

¹ Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine, Kharkov, Ukraine

² Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Культура клітин фолікулярної лімфоми ембріональної нирки вівці FLK-BLV в Україні використовується в біотехнології виробництва лейкозного антигену для серологічної діагностики лейкозу великої рогатої худоби. Тому виникла необхідність розробити спосіб кріоконсервування штаму перещеплених клітин нирки вівці FLK-SBBL, який продукує вірус лейкозу великої рогатої худоби.

Збудник лейкозу великої рогатої худоби – онкогенний РНК-вірус з родини ретровірусів, який паразитує у лейкоцитах, має близьку генетичну й антигенну спорідненість з вірусом Т-клітинного лейкозу людини типів 1 і 2 та Т-клітинного лейкозу мавп. При дотриманні оптимальних умов культивування хронічно інфіковані клітинні лінії (FLK-BLV) здатні забезпечити репродукцію вірусу протягом тривалого часу (понад 200 пасажів). Перещеплювана культура клітин фолікулярної лімфоми ембріональної нирки вівці FLK-BLV (FLK-SBBL, FLK 50/100, FLK 71) складається з фібробластоподібних клітин з округлими ядрами; ріст клітин нерівномірний, ядра мають від 2 до 7 дрібних ядерців різноманітної форми; цитоплазма дрібносітчаста. Реплікація вірусу лейкозу не супроводжується руйнуванням моношару клітин. Сублінія культури FLK-BLV була отримана в 1973–1974 роки Van der Maaten у США (National Animal Disease Center, Айова) з ембріональної нирки вівці шляхом подальшої інюкуляції клітин лейкоцитами від хворої лейкозом великої рогатої худоби. Розроблений спосіб включає поетапне заморожування: на першому етапі протягом години при температурі 4°C, на другому – в парах рідкого азоту протягом 18 годин з наступним зануренням у рідкий азот; суміш поживних середовищ DMEM і 199 (1:1) (70%), з сироваткою крові великої рогатої худоби (20%) та диметилсульфоксиду (10%).

Cell culture of follicular lymphoma of fetal lamb kidney FLK-BLV was used in Ukraine in biotechnology of leukemic antigen production for serological diagnosis of bovine leukemia. Therefore, it was necessary to develop the cryopreservation method for strain of inoculated lamb kidney FLK-SBBL cells, producing a virus of bovine leukemia.

The pathogenic agent of bovine leukemia is oncogenic RNA virus of retroviruses family, parasitizing in leukocytes is of close genetic and antigenic relation with virus of T-cell human leukemia of types 1 and 2, and T-cell leukemia of monkeys. When keeping optimal culturing conditions, chronically infected cell lines (FLK-BLV) can provide reproduction of virus for a long time (more than 200 passages). Inoculated cell culture of follicular lymphoma of fetal lamb kidney FLK-BLV (FLK-SBBL, FLK 50/100, FLK 71) consists of fibroblast cells with rounded nuclei, cell growth is irregular, nucleus has from 2 to 7 small nucleoli of varied shapes; small-netted cytoplasm. Leukemia virus replication is not accompanied by destruction of monolayer cells. In 1973–1974 FLK-BLV subline culture was obtained by Van der Maaten in the USA (National Animal Disease Center, Ames, Iowa) from fetal lamb kidney by further cell inoculation with leukocytes from animals with leukemia. The developed method includes a stepwise freezing: the first stage is exposure for an hour at 4 °C, the second one – in liquid nitrogen vapors for 18 hours with further plunging into liquid nitrogen, a mixture of nutritional media DMEM and 199 (1:1) (70%), with bovine serum (20%) and dimethyl sulfoxide (10%).

Перспективы использования криоконсервации для черенков груши (*Pyrus L.*), сохраняемых в парах жидкого азота

В.Г. ВЕРЖУК¹, А.С. ЖЕСТКОВ², В.М. КОТОВ³, Ю.В. ЖЕЛТИКОВ¹, Д.С. ДОРОХОВ²

¹ГНУ ВНИИР им. Н.А. Вавилова Россельхозакадемии, г. Санкт - Петербург

²ГНЦ РФ ВНИИГ и СПР им. И.В. Мичурина Россельхозакадемии, г. Мичуринск

³Майкопская опытная станция ВИР им. Н.И. Вавилова Россельхозакадемии

Perspectives of Using Cryopreservation for Pear (*Pyrus L.*) Shoots Preserved in Liquid Nitrogen Vapours

V.G. VERZHUK¹, A.S. ZHESTKOV², V.M. KOTOV³, YU.V. ZHELTIKOV¹, D.S. DOROKHOV²

¹N.I. Vavilov Research Institute of Plant Industry of Russian Agricultural Academy, St.-Petersburg, Russia

²I.V. Michurin Research Institute of Genetics and Selection of Horticultural Plants of Russian Agricultural Academy, Michurinsk, Russia

³Maikop Experimental Station of N.I. Vavilov All-Russia Research Institute of Plant Industry of Russian Agricultural Academy, Maikop, Russia

Задача сохранения генофонда культурных растений является одной из главных в растениеводстве, поскольку в условиях постоянного воздействия неблагоприятных экологических, климатических, техногенных и антропогенных факторов невозможно гарантировать сохранность уникальных генотипов [Грищенко и др., 2004].

На основе метода Форслина [Forslin *et al.*, 1988] нами были отработаны методы криоконсервирования плодовых и ягодных культур при длительном (1,5–2 месяца) подсушивании черенков до влажности 28–35% [Вержук и др., 2010].

Основная цель данной работы – проведение криоконсервирования побегов груши (*Pyrus L.*) с закладкой на длительное хранение в парах азота при –183...–185°C и определение их жизнеспособности путем прививки в коллекционных садах на ветви взрослых деревьев.

Материалом исследования были образцы коллекционных сортов груши (*Pyrus L.*) из сада ВНИИГ и СПР им. Мичурина и Майкопской опытной станции ВИР. После подсушивания в низкотемпературном инкубаторе черенки замораживали методом программного замораживания вначале до –30°C со скоростью охлаждения 0,5 град/мин, затем до –90°C, увеличив скорость охлаждения до 1 град/мин, затем черенки погружали на длительное хранение в пары азота (–183...–185°C). Весной для оценки жизнеспособности часть сохраняемых черенков размораживали и прививали на ветви взрослых деревьев. Через 1,5–2 месяца после прививки (май-июнь) оценивали процент, рост и развитие прижившихся черенков летом.

Анализ приживаемости черенков груши, привитых в коллекционных садах, показал различную их жизнеспособность в зависимости от сортов. В процентном отношении эти различия составляли от 23,2 ± 1,4 до 86,7 ± 6,2%. Высокая жизнеспособность черенков коллекции ВНИИГ и СПР им. И.В. Мичурина была у сортов Скоропелка (54,5 ± 1,1%) и Чудесница (50,0 ± 0,8%), а у сортов Майкопской опытной станции – Рассвет и Глива Курская (86,7 ± 6,2%).

Таким образом, после криоконсервирования и длительного хранения в парах азота черенки груши сохраняли жизнеспособность и показывали различную приживаемость в саду в зависимости от сортов.

The task of preserving gene pool of cultivated plants is one of the main ones in plant growing, since under constant unfavourable effects of ecological, climatic, man-caused and anthropogenic factors it is impossible to guarantee the preservation of unique gene types [Grishchenko *et al.*, 2004].

On the base of Forslin method [Forslin *et al.*, 1988] we have performed the cryopreservation method of horticultural and berry cultures at long-term (1.5-2 months) pre-drying of the shoots to the humidity of 28-35% [Verzhuk *et al.*, 2010].

The main aim of this work was to cryopreserve the pear (*Pyrus L.*) shoots by storing in nitrogen vapours at –183...–185°C as well as to assess their viability by grafting in collection gardens on branches of adult trees.

Research material were the samples of collection species of pear (*Pyrus L.*) from the garden of I.V. Michurin Research Institute of Genetics and Selection of Horticultural Plants and Maikop Experimental Station of N.I. Vavilov All-Russia Research Institute of Plant Industry. After pre-drying in low temperature incubator the shoots were frozen down to –30°C with cooling rate of 0.5 deg/min and then down to –90°C with increased up to 1 deg/min cooling rate, then the shoots were plunged into nitrogen vapours (–183...–185°C) for a long-term storage. In spring to estimate the viability the part of the shots to be preserved were thawed and grafted to the branches of adult trees.

Analysis of pear shoots' survival grafted in the collection gardens has shown their different viability depending on the species. In a percentage these differences made from 23.2 ± 1.4 to 86.7 ± 6.2%. High viability of the shoots of I.V. Michurin Research Institute of Genetics and Selection of Horticultural Plants' collection was found for the Skorospelka (54.4 ± 1.1%) and Chudesnitsa (50.0 ± 0.8%) species and for the ones of Maikop experimental station these were Rassvet and Gliva Kurskaya (86.7 ± 6.2%).

Thus after cryopreservation and long-term storage in nitrogen vapours the pear shoots preserved the viability and showed different grafting in a garden depending on the species.

Параметри проростання і морозостійкість проростків озимих культур після передпосівної обробки насіння кріопротекторами

Г.Ю. ДЬЯКОНЕНКО, А.М. КОМПАНИЕЦЬ, А.М. ГОЛЬЦЕВ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Parameters of Germination and Frost Hardiness of Winter Crops Sprouts After Pre-Seeding Treatment of Seeds by Cryoprotectants

G.YU. DYAKONENKO, A.M. KOMPANIYETS, A.M. GOLTSEV

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

Загибель озимих культур внаслідок вимерзання завдає значних економічних збитків нашій країні. В Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України протягом багатьох років проводяться дослідження дії низьких температур і різних класів хімічних сполук на рослини у період їх активної життєдіяльності з метою підвищення їх стійкості до дії несприятливих природних умов (заморозки, інфекції, тощо). Підсумком цієї роботи є розробка комплексних агрохімічних препаратів «Дорсай» і «Юпітер» для передпосівної обробки насіння і вегетативних рослин з метою підвищення їх стійкості до дії низьких температур.

У даній роботі досліджено вплив передпосівної обробки насіння озимого ріпака і озимої пшениці розчинами цих препаратів, а також кріопротекторів поліетиленоксидів на біометричні параметри їх проростання при різних температурах, морозостійкість проростків, вміст розчинних вуглеводів у рослинах.

Експерименти проводили в лабораторних умовах з насінням озимої пшениці сорту Харківська-105, озимого ріпака сортів Дангал і Атлант. Ріпак Дангал також висівали у відкритому ґрунті. Застосовували розчини різних концентрацій кріопротекторів ПЕО-400 і ПЕО-1500, комплексних агрохімічних препаратів «Юпітер» і «Дорсай». Лабораторну схожість визначали за умов фонові температури (20°C) і низької позитивної температури (5...10°C). Визначали вміст розчинних вуглеводів у надземній частині свіжих рослин. Морозостійкість рослин досліджували за методом проростків при їх проморожуванні до -7, -15 і -20°C.

Встановлена стимулююча дія передпосівної обробки насіння обох культур розчинами кріопротекторів і препаратів «Дорсай» та «Юпітер» при їх пророщуванні при зниженій (5-10°C) температурі, а також підвищення морозостійкості проростків ріпака і пшениці після проморожування до -7, -15 і -20°C. Так, після проморожування проростків обробленої пшениці до -20°C вижило до 87,4% (при 67,7% у контролі), а проростків ріпака до -15°C різниця була ще більшою: 96,9% у кращому варіанті при 55,1% у контролі.

Виявлено, що в проростках пшениці і ріпака, вирощених з обробленого насіння, акумулюється достовірно більше розчинних вуглеводів у порівнянні з контрольними. Дослідженнями не виявлено хромосомних аберацій і підвищення кількості мікроядер у досліджених зразках, що свідчить про відсутність токсичної дії даних препаратів на ці види рослин.

Передпосівна обробка насіння ріпака і пшениці розчинами кріопротекторів ПЕО-400, ПЕО-1500, препаратів «Дорсай» і «Юпітер» стимулює проростання насіння при зниженій (5...10°C) температурі, підвищує морозостійкість проростків, а також акумуляцію розчинних вуглеводів у рослинах. Встановлена відсутність токсичної дії препаратів на генетичний апарат ріпака і пшениці.

The death of winter crops resulted from freezing-out causes significant economic damages in our country. The investigations of influence of low temperatures and various classes of chemical compounds on plants during their vital activity to increase their resistance to the effect of unfavourable environmental conditions (frosts, infections *etc.*) have been carried-out at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine for many years. The development of complex agrochemical formulations Dorsaj and Yupiter for pre-seeding treatment of seeds and vegetative plants to increase their resistance to low temperatures is the result of this work.

The influence of pre-seeding treatment of seeds of winter rape and winter wheat by solutions of these chemicals and also cryoprotectants of polyethylene oxides on biometric parameters of their germination at various temperatures, frost resistance of sprouts, the content of soluble carbohydrates in plants are investigated in this work.

Experiments were carried-out in laboratory conditions with seeds of winter wheat of a cultivar Kharkivs'ka-105 and winter rape of cultivars Dungal and Atlant. The Dungal rape was also sowed in open soil. The solutions in various concentrations of cryoprotectants PEO-400 and PEO-1500 and complex agrochemical formulations Dorsaj and Yupiter were applied. Laboratory similarity in conditions of background temperature (20°C) and low positive temperature (5...10°C) was determined. The content of soluble carbohydrates in a top part of fresh plants was determined. Frost resistance of plants was investigated by method of sprouts at their frost penetration down to -7, -15 and -20°C.

The stimulating effect of pre-seeding treatment of seeds of both cultures by cryoprotective solutions and formulations chemicals Dorsaj and Yupiter at their germination at lowered (5...10°C) temperature, and also the increase of frost resistance of sprouts of rape and wheat after frost penetration down to -7, -15 and -20°C are established. After freezing of sprouts of processed wheat down to -20°C survived up to 87.4 % (67.7 % in the control). Rape sprouts were frozen down to -15°C and the difference was even higher: 96.9 % in the best option vs. 55.1% in the control.

In sprouts of wheat and rape which are grown from the processed seeds a significantly higher content of soluble carbohydrates was revealed comparing with the control. Chromosome aberrations and the increase in quantity of micronuclei in the studied samples are not revealed during the investigations that testifies to the absence of toxic action of these chemicals on these types of plants.

Pre-seeding treatment of seeds of rape and wheat by cryoprotective solutions of PEO-400, PEO-1500, formulations Dorsaj and Yupiter stimulates germination of seeds at lowered (5...10°C) temperature, increases frost resistance of sprouts, and also accumulation of soluble carbohydrates in plants. The absence of toxic effect of chemicals on genetic apparatus of rape and wheat is found.

Криоконсервирование меристем чеснока в комбинированных криозащитных средах

Ю.С. ЛЫСАК, А.Т. ХОДЬКО, Т.Ф. СТРИБУЛЬ, А.М. КОМПАНИЕЦ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Garlic Meristem Cryopreservation in Combined Cryoprotective Media

YU.S. LYSAK, A.T. KHODKO, T.F. STRIBUL, A.M. KOMPANIETS

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

В практике криоконсервирования меристем чеснока более широкое применение нашли режимы быстрого охлаждения.

Цель настоящей работы – исследование эффективности режима плавного замораживания меристем чеснока с использованием криозащитных сред на основе смесей криопротекторов ряда амидов, диолов, полиолов. Исследовали целесообразность использования этапа предварительной холодовой адаптации (закаливание) для повышения жизнеспособности меристем чеснока после криоконсервирования.

Меристемы чеснока (*Allium sativum*) выделяли из зубков на среду культивирования Murashige & Skoog (MS). Закаливание проводили в течение 5 суток при 10°C на среде MS без фитогормонов, с концентрацией сахаразы 0,3 М. Закаленные и незакаленные меристемы криоконсервировали. Использовали следующие растворы криопротекторов на среде MS: 1) 1,2-пропандиол (1,2-ПД) в концентрации 1 М и поливинилпирролидон (ПВП) с м.м. 24000 в концентрации 3,5%; 2) метилацетамид (МАц) 0,5 М и полиэтиленоксид (ПЭО)-6000 – 3,5%; 3) 1,2-ПД 1 М, МАц 0,5 М и ПВП–3,5%; 4) 1,2-ПД 1 М, МАц 0,5 М и ПЭО-6000 – 3,5%.

Была также исследована эффективность замораживания меристем без криопротекторов.

Замораживали меристемы в герметичных пленочных контейнерах в парах азота с последующим погружением в жидкий азот, отогревали их на воздухе при 20°C, отмывали от криопротекторов и культивировали в условиях фитотрона. Оценивали сохранность (5-е сутки культивирования) и жизнеспособность (30-е сутки) меристем.

Проведенные эксперименты показали, что во всех группах меристем сохранность после криоконсервирования была не ниже 80%.

Сохранность предварительно закаленных и криоконсервированных в 3-компонентных криозащитных средах меристем практически не отличалась от сохранности незакаленных (соответственно 90–95%). Для меристем, криоконсервированных в 2-компонентных средах, этот показатель составлял 80–85% для незакаленных и 90–95% – для закаленных. Показатели жизнеспособности криоконсервированных меристем по абсолютным величинам были меньше показателей сохранности, однако и в данном случае 3-компонентные криозащитные среды были более эффективны (75 и 60% живых меристем) по сравнению с 2-компонентными (50 и 25%).

Жизнеспособность меристем, замороженных без криопротекторов, составила 55% для незакаленных образцов и 70% – для закаленных. Это свидетельствует о хорошем состоянии объекта и эффективном режиме замораживания-отогрева.

The regimens of rapid cooling have become more widely applied in practice of garlic meristem cryopreservation.

This research aim was to study the efficiency of mild freezing regimen for garlic meristems with use of cryoprotective media, based on cryoprotectant mixtures of amide, diol and polyol series. The expediency of using the preliminary cold adaptation stage (hardening) to increase garlic meristem viability after cryopreservation was under study.

The garlic meristems (*Allium sativum*) were isolated from cloves in Murashige & Skoog (MS) culture medium. Hardening was implemented within 5 days at 10°C in MS medium without phytohormones, with 0.3 M sucrose concentration. The hardened and non-hardened meristems were cryopreserved. The following cryoprotective solutions were used on the base of MS medium: 1) 1,2-propanediol (1,2-PD) in 1 M concentration and polyvinylpyrrolidone (PVP) with m.m. 24000 in 3.5% concentration; 2) methylacetamide (MAc) 0.5 M and polyethylene oxide (PEO) – 6000 3.5%; 3) 1,2-PD 1 M, MAc 0.5 M and PVP 3.5%; 4) 1,2-PD 1 M, MAc 0.5 M and PEO-6000 3.5%.

The efficiency of meristems freeze-thawing without cryoprotectants was also assessed.

The meristems were frozen in sealed film containers in nitrogen vapor followed by immersion into liquid nitrogen, then thawed in air at 20°C, washed from cryoprotectants and cultured under phytotron conditions. There were assessed the integrity (5th day of culture) and viability (30th day) of meristems.

The experiments performed demonstrated the survival after cryopreservation in the all the meristem groups to be not lower than 80%. The integrity of pre-hardened and cryopreserved in 3-component cryoprotective media meristems almost did not differ from that in non-hardened ones (90–95%, correspondingly). For the meristems, cryopreserved in 2-component media, this index for non-hardened and hardened ones was 80–85% and 90–95%, correspondingly. The viability indices of cryopreserved meristems by the absolute values were lower than those of integrity, but in this case 3-component cryoprotective media were more efficient (75 and 60% of live meristems), compared to the 2-component ones (50 and 25%).

The viability of meristems, frozen without cryoprotectants for non-hardened and hardened samples made 55 and 70%, correspondingly. This testifies to a good state of the object and efficient regimen of freeze-thawing.