

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

УЛІЗКО ПАВЛО ЮРІЙОВИЧ

УДК: 591.111.1:57.086.13:547.42:547.569.2:544.344.015.4

ДИСЕРТАЦІЯ

КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ЕРИТРОЦИТІВ ССАВЦІВ ІЗ
ЗАСТОСУВАННЯМ КОМБІНОВАНИХ КРІОЗАХИСНИХ СЕРЕДОВИЩ

03.00.19 – кріобіологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____ (підпис, ініціали та прізвище здобувача)

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор

Нардід Олег Анатолійович,

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини

НАН України, м. Харків

завідувач відділу кріобіофізики.

Харків – 2021

АНОТАЦІЯ

Улізко П.Ю. Кріоконсервування еритроцитів ссавців із застосуванням комбінованих кріозахисних середовищ. – Кваліфікаційна робота на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2021.

Дисертаційна робота присвячена розробці ефективного комбінованого кріозахисного середовища для кріоконсервування еритроцитів ссавців.

В роботі визначені температури фазових переходів і склування в суспензіях еритроцитів коня з широко вживаними в кріобіології кріопротекторами: гліцерином, 1,2-пропандиолом (1,2-ПД), диметилсульфоксидом (ДМСО) і поліетиленоксидом з молекулярною масою 1500 (ПЕО-1500). Показано, що в присутності ПЕО-1500 температура склування на $30 \div 50$ °С вище, ніж при використанні інших досліджених кріопротекторів. Найнижча температура склування зареєстрована при охолодженні суспензій еритроцитів у присутності ДМСО. Температура склування є важливим показником при розробці протоколів кріоконсервування біооб'єктів, оскільки це температура повного тверднення усієї рідини зразка і зберігати суспензії еритроцитів потрібно нижче цієї температури. У дисертаційній роботі вперше досліджені фізичні процеси в суспензіях еритроцитів ссавців з комбінованими кріозахисними середовищами при охолодженні до -196 °С та проаналізовано закономірності впливу різних кріозахисних речовин на температури фазових переходів і склування у багатокомпонентних середовищах. Встановлено, що температура склування у комбінованому середовищі знижується при збільшенні концентрації ДМСО і підвищується при збільшенні концентрації ПЕО-1500 та при додаванні сахарози. Виявлено, що температура склування еритроцитів в комбінованих кріозахисних середовищах, які містять ПЕО-1500, ДМСО, 1,2-ПД і сахарозу підвищується в порівнянні з

температурою склування середовищ на основі ДМСО, що дозволяє розширити діапазон можливих температур зберігання еритроцитів ссавців в цих середовищах. Рекомендована температура зберігання еритроцитів коня, бика і кролика в середовищах, які містять ПЕО-1500, ДМСО, 1,2-ПД і сахарозу нижче $-95\text{ }^{\circ}\text{C}$, що достовірно вище рекомендованої температури зберігання при використанні розчину ДМСО (нижче $-125\text{ }^{\circ}\text{C}$). Тому комбіновані кріозахисні середовища є більш придатними для практичного використання. Виявлено, що склоутворююча здатність комбінованого середовища у більшому ступеню залежить від сумарної концентрації кріопротекторів у розчині, ніж від типу кріопротектору.

Кріозахисні розчини на основі ДМСО і ПЕО-1500 мають високу схильність до кристалізації евтектичних складів, на відміну від середовищ на основі гліцерину і 1,2-ПД, для яких розвиток цього процесу не є характерним. Уперше показано, що застосування комбінованих кріозахисних середовищ дозволяє уникнути розвитку кристалізації евтектичних складів, характерної для однокомпонентних кріозахисних середовищ на основі ПЕО-1500 або ДМСО, що дозволяє виключити один з факторів кріопошкоджень. Виявлено, що високомолекулярний кріопротектор ПЕО-1500 відіграє вирішальну роль у розвитку кристалізації евтектичних складів у комбінованих розчинах, перешкоджаючи кристалізації при температурі характерній для евтектики вода – ДМСО. Додавання сахарози у комбіновані кріоконсервуючі розчини сприяє запобіганню розвитку кристалізації евтектичних складів незалежно від співвідношення ПЕО-1500 та ДМСО у середовищі.

Встановлено, що флуоресцентний барвник 3-DAV (3-диметиламінобензантрон) ефективно забарвлює мембрани еритроцитів коня, бика і кролика. При дії пошкоджуючих факторів кріоконсервування мембрани частини еритроцитів набувають більш пухку структуру і кількість гідрофобних місць зв'язування зонда збільшується, що призводить до збільшення флуоресценції клітин з пошкодженими мембранами. Це робить

можливим успішно застосовувати флуоресцентний барвник 3-DAB у проточно-цитофлуориметричному аналізі та флуоресцентній мікроскопії для оцінки стану еритроцитів тварин після кріоконсервування. Однокомпонентне кріозахисне середовище на основі ДМСО недостатньо ефективно при кріоконсервуванні еритроцитів коня і більшість клітин, які збереглися після заморожування, не відновлюють свої морфологічні характеристики. При консервуванні еритроцитів коня, бика і кролика у комбінованому кріозахисному середовищі не тільки знижуються загальні втрати клітин у порівнянні з розчином ДМСО, але й також еритроцити, які збереглися після всіх етапів кріоконсервування, більш близькі до контрольних. Це особливо актуально для еритроцитів коня, які більш чутливі до пошкоджуючої дії кріобіологічних факторів.

Уперше проаналізовано вплив зміни концентрації компонентів комбінованого середовища на гемоліз еритроцитів на різних етапах кріоконсервування. Виявлено, що незначна добавка в комбіноване середовище сахарози дозволяє істотно зменшити гемоліз еритроцитів при заморожуванні. Використання ДМСО при концентрації в суспензії вище 5% призводить до достовірного підвищення рівня гемолізу ще на етапі інкубації. Підвищення концентрації ПЕО-1500 дозволяє істотно знизити рівень гемолізу еритроцитів на етапі заморожування - відігріву. Однак спостерігається різке зростання рівня гемолізу на етапі видалення кріопротектору. З еритроцитами кролика не вдалося оцінити дієвість однокомпонентного кріозахисного середовища на основі ПЕО-1500, оскільки при змішуванні з ним спостерігалось згортання еритроцитів. При цьому зменшення концентрації цього кріопротектора у комбінованому середовищі не призводить до згортання і дозволяє успішно консервувати еритроцити кролика. Уперше встановлено, що збереженість еритроцитів бика, кролика і коня вища після кріоконсервування з комбінованими кріозахисними середовищами, ніж з однокомпонентними. Розроблено нове кріозахисне середовище з 15% ПЕО-1500, 10% ДМСО, 5% 1,2-ПД і 5% сахарози, яке

ефективно зберігає еритроцити бика, коня, кролика і людини в процесі кріоконсервування. Показано, що після заморожування у розробленому комбінованому середовищі гемоліз еритроцитів бика складає 5,2%, кролика - 6,4%, коня - 7,2%, а людини - 5,9 %. Після всіх етапів кріоконсервування (інкубації з кріозахисним середовищем, заморожування-відігрівання, процедури видалення кріопротекторів і перенесення в ізотонічне середовище) рівень гемолізу еритроцитів суттєво зростає, але вдається отримати від 74,6 % до 81,6% збережених клітин, залежно від виду ссавців.

Найменший індекс осмотичної крихкості виявлено для еритроцитів кролика, що, можливо, пов'язано з їх структурними особливостями, так як відомо, що в мембранах еритроцитів кролика міститься більше фосфоліпідів, менше гліколіпідів і холестеролу, ніж в мембранах еритроцитів бика і коня. Можна відмітити, що індекс осмотичної крихкості еритроцитів кролика після всіх етапів кріоконсервування схожий з показниками контрольної групи, що свідчить про їх більшу осмотичну стійкість. Порівнюючи ефективність однокомпонентного середовища з ДМСО і комбінованого кріозахисного середовища можна відмітити, що на етапі інкубації з кріопротектором індекс осмотичної крихкості еритроцитів бика, коня і кролика нижчий у комбінованому середовищі, що говорить про його меншу цитотоксичність. Після заморожування-відігріву еритроцитів бика різниця між індексами осмотичної крихкості клітин з ДМСО і комбінованим середовищем нівелюється. З еритроцитами кролика і коня індекс осмотичної крихкості еритроцитів з комбінованим середовищем на всіх етапах кріоконсервування достовірно нижчий, ніж з однокомпонентним середовищем на основі ДМСО.

Таким чином, застосування багатоконпонентних середовищ з сумішшю екзо- та ендоцелюлярних кріопротекторів дозволяє знизити концентрацію кожного з них і, відповідно, можливу токсичну дію. При цьому у суспензії клітин досягається достатньо висока сумарна концентрація кріозахисних речовин як у внутрішньоклітинному, так і зовнішньоклітинному середовищі.

Це дає можливість отримати високі показники збереженості еритроцитів при кріоконсервуванні у комбінованому захисному середовищі. Істотно вища ефективність комбінованих кріозахисних середовищ при заморожуванні суспензій еритроцитів може бути також пов'язана з їх високою склоутворюючою здатністю, а також з тим, що їх застосування дозволяє запобігти такому фактору кріопошкодження, як кристалізація евтектичних складів.

Моделювання трансфузії досліджених еритроцитів ссавців показало, що як інкубація з кріозахисним середовищем, так і подальше заморожування-відігрівання впливають на стан еритроцитів і їх гемоліз достовірно збільшується. Показано, що після кріоконсервування у комбінованому кріозахисному середовищі осмотичні властивості деконсервованих еритроцитів ссавців кращі і при моделюванні трансфузії їх гемоліз нижче, ніж с середовищем на основі ДМСО. Виявлено, що після етапа інкубування з розробленим комбінованим кріоконсервуючим середовищем, близько 97% деконсервованих еритроцитів бика, коня, кролика і людини залишаються збереженими після інкубації в плазмі і фізіологічному розчині при температурі 37 °С протягом 24 годин. Достовірно нижчий рівень гемолізу (2% у плазмі) зареєстровано для еритроцитів кролика, порівняно зі іншими дослідженими ссавцями. Після всіх етапів кріоконсервування гемоліз еритроцитів достовірно зростає, порівняно з контролем, але рівень його залишається в межах 5-6% залежно від виду ссавців. Але навіть після всіх етапів кріоконсервування близько 94% деконсервованих еритроцитів досліджених ссавців залишаються збереженими після інкубації в плазмі і фізіологічному розчині при температурі 37 °С протягом 24 годин. Кількість еритроцитів загиблих при моделюванні трансфузії протягом 24 годин після інкубації з ДМСО і після всіх етапів кріоконсервування з ним достовірно більша, ніж з комбінованим кріозахисним середовищем.

Отже, проведені наукові дослідження обґрунтовують доцільність використання комбінованих кріозахисних середовищ при кріоконсервуванні

еритроцитів ссавців. Отримані результати є підґрунтям для розробки технології низькотемпературного зберігання еритроцитів ссавців з покращеним рівнем збереженості клітин в процесі кріоконсервування. Розроблене кріоконсервуюче середовище 15% ПЕО-1500, 10% ДМСО, 5% 1,2 ПД і 5% сахарози має високу ефективність при кріоконсервуванні еритроцитів різних видів ссавців і є найбільш універсальним з досліджених на даний час кріозахисних розчинів.

Ключові слова: еритроцити ссавців, кріоконсервування, комбіновані кріозахисні середовища, низькотемпературні фазові переходи, гемоліз, осмотична крихкість.

Список публікацій здобувача

Статті у фахових журналах України

1. **Ulizko PYu**, Bobrova OM, Nardid OA, Zubov PM, Kovalenko IF, Kuchkov VM, Vodopianova LA. Cryopreservation of equine and bovine erythrocytes using combined protective media. *ProblCryobiolCryomed.* 2019;29(3):255-65. (*Scopus*) DOI: 10.15407/cryo29.03.255
2. **Улизко ПЮ**, Жегунов ГФ, Боброва ЕН, Зинченко АВ. Влияние смесей криопротекторов на сохранность кріоконсервированных эритроцитов млекопитающих. *Вісник проблем біології і медицини.* 2011;3(3):26-9. (*eLIBRARY.ru*)
3. **Улизко ПЮ**, Боброва ЕН, Зинченко АВ, Жегунов ГФ. Фазовые переходы и стеклование в криозащитных средах и суспензиях эритроцитов лошади ниже 0°C. *Вісник проблем біології і медицини.* 2011;3(2):253-6. (*eLIBRARY.ru*)
4. **Улизко ПЮ**, Жегунов ГФ, Денисова ОН. Влияние кріоконсервирования с ДМСО на сохранность и осмотическую хрупкость эритроцитов различных видов млекопитающих. *Проблемы криобиологии.* 2011;21(1):52-7. (*eLIBRARY.ru*)

Статті в наукових журналах інших країн

5. **Ulizko P**, Bobrova E, Nardid O, Vodopyanova L, Repina S. New cryoprotective media for cryopreservation of mammal erythrocytes. *Trakia Journal of Sciences*. 2019;17(4):303-7. DOI: 10.15547/tjs.2019.04.001

6. **Улизко ПЮ**, Боброва ЕН, Жегунов ГФ. Осмотические свойства эритроцитов млекопитающих, криоконсервированных в присутствии комбинированных криозащитных сред. *Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук*. 2014;6(1):100-7. (*eLIBRARY.ru*)

Статті в інших наукових журналах

7. **Ulizko PY**, Bobrova OM, Nardid OA, Zubov PM, Hovorova YuS, Kovalenko IF. Evaluation of efficiency of equine erythrocyte cryopreservation using fluorescent dyes *Альманах науки*. 2018;13(4):14-7.

Статті в збірках матеріалів конференцій

8. **Ulizko P**, Bobrova O, Nardid E, Goriacha I, Schetinsky M. Cryopreservation of animals' erythrocytes. *Proceedings of the International Academic Congress. European Research Area: Status, Problems and Prospects. Section 2 Biology*; 2016. Latvia, Riga; p. 13-5.

9. **Улизко ПЮ**, Боброва ЕН, Кучков ВН, Водопьянова ЛА, Говорова ЮС. Современные методы долгосрочного хранения эритроцитов сельскохозяйственных животных. *Актуальные проблемы зоологической науки в Беларуси. Сборник статей XI Зоологической Международной научно-практической конференции*; 2017. Беларусь, Минск: А.Н. Вараксин; 1:393-7.

Тези конференцій

10. **Ulizko P**, Bobrova O, Vodopyanova L, Mangasarov D. Complex cryopreservation medium for mammalian erythrocytes. *Cryo 2020. The 57th annual meeting of the Society for cryobiology. Abstracts*; 2020 July 21-23; Virtual annual meeting; 2020, p.65.

11. **Ulizko PYu**, Bobrova OM, Vodopyanova LA. Application of fluorescent dyes to assess the state of bovine and equine erythrocytes after cryopreservation. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2018;28(2):189. (*Scopus*)

12. **Ulyzko PYu**, Bobrova OM, Vodopyanova LA. Influence of low-temperature phase transitions on erythrocytes integrity. *ProblCryobiolCryomed*. 2019;29(2):179. (*Scopus*)

13. **Улізко ПЮ**, Боброва ОМ. Низькотемпературні фазові переходи під час криоконсервування еритроцитів коня з використанням комбінованих криозахисних середовищ. *Проблемы криобиологии и криомедицины*. 2017;27(2):178. (*Scopus*)

14. Говорова ЮС, Зінченко ОВ, Боброва ОМ, Нардід ОА, Репіна СВ, **Улізко ПЮ**. Вплив 1,2-пропандіолу на конформаційну стабільність гемоглобіну бика і коня. *Біологія тварин*. 2018; 20(3):105.

15. **Улизко ПЮ**, Боброва ЕН, Нардид ОА, Водопьянова ЛА, Кучков ВН. Применение комбинированной криозащитной среды при криоконсервировании эритроцитов человека, быка, коня и кролика. *Стратегії інноваційного розвитку природничих дисциплін: досвід, проблеми та перспективи*; 2019; Кропивницький, 141-2.

16. Житняковська ОА, **Улизко ПЮ**, Соколик ОА, Дюбко ТС, Жегунов ГФ. Дослідження кріочутливості еритроцитів тварин в умовах низькотемпературного консервування із застосуванням флуоресцентних методів. *Збірник тез VI Міжнар. наук. конфер. Молодь і поступ біології*; 2010; Львів, с.9.

17. **Улизко ПЮ**, Боброва ЕН, Жегунов ГФ, Зинченко АВ. Применение комбинированных криозащитных сред при криоконсервировании эритроцитов млекопитающих. *Биология – наука XXI века. 17-я Международная Пущинская школа- конференция молодых ученых. Сборник тезисов*. 2013 апр. 21-26; Пущино; 2013, с. 157-8.

18. **Улізко ПЮ**, Боброва ОМ. Вплив кріопротекторів і низьких температур на збереженість еритроцитів бика, коня та кролика. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2016; 26(2):184.

19. Sokolyk O, Dyubko T, Linnik T, Tatars A, **Ulizko P.** et al. Investigation of the cryoprotectant-initiated changes of horse and goat erythrocyte membranes using fluorescent probe SQUARE-660. 17 th International symposium "EARCR". Milano, Italy, 23-27 April 2009, p. 77.

Патенти України на корисну модель

20. Патент №106776, Україна, МПК G01N 24/14(2006.01). Заявл. 19.10.2015, з.н. u201510201. Спосіб кріоконсервування еритроцитів тварин. Публ.10.05.2016. Бюл.№9. Заявник **П.Ю. Улізко**, О.М. Боброва, О.А. Нардід, О.В. Зінченко, Г.Ф. Жегунов, Л.А. Водоп'янова

ANNOTATION

Ulizko P.Yu. Cryopreservation of mammalian erythrocytes with the use of combined cryoprotective media. – Qualification scientific paper as a manuscript.

Thesis for a PhD Degree in Biology, specialty 03.00.19 “Cryobiology”. — Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2021.

The dissertation covers the development of an effective combined cryoprotective medium for cryopreservation of mammalian erythrocytes.

Phase transition and glass transition temperatures in horse erythrocyte suspensions with cryoprotectors widely used in cryobiology were determined: glycerol, 1,2-propanediol (1,2-PD), dimethyl sulfoxide (DMSO) and polyethylene oxide with a molecular weight of 1500 (PEO-1500). It has been shown that in the presence of PEO-1500 the glass transition temperature is $30 \div 50$ °C higher than when using other investigated cryoprotectants. The lowest glass transition temperature was recorded when cooling erythrocyte suspensions in the presence of DMSO. The glass transition temperature is an important indicator in the development of cryopreservation protocols for biological objects, as it is the temperature of complete solidification of all sample fluid and erythrocyte suspensions should be stored below this temperature. In the dissertation work for the first time physical processes in suspensions of mammalian erythrocytes with combined cryoprotective media at cooling to -196 °C were investigated and regularities of influence of various cryoprotective substances on temperature of phase transitions and glass transition in multicomponent media were analyzed. It was found that the glass transition temperature in the combined medium decreases with increasing concentration of DMSO and increases with increasing concentration of PEO-1500 and with the addition of sucrose. It was found that the glass transition temperature of erythrocytes in combined cryoprotective media containing PEO-1500, DMSO, 1,2-PD and sucrose increases compared with the

glass transition temperature of DMSO-based media, which allows to expand the range of possible storage temperatures of mammalian erythrocytes in these media. The recommended storage temperature of erythrocytes of horse, bull and rabbit in media containing PEO-1500, DMSO, 1,2-PD and sucrose is below $-95\text{ }^{\circ}\text{C}$, which is significantly higher than the recommended storage temperature when using a solution of DMSO (below $-125\text{ }^{\circ}\text{C}$). Therefore, combined cryoprotective media are more suitable for practical use. It was found that the glass-forming ability of the combined medium depends to a greater extent on the total concentration of cryoprotectants in solution than on the type of cryoprotectant.

Cryoprotective solutions based on DMSO and PEO-1500 have a high tendency to crystallize eutectic compositions, in contrast to media based on glycerol and 1,2-PD, for which the development of this process is not typical. For the first time it has been shown that the use of combined cryoprotective media avoids the development of crystallization of eutectic compositions, characteristic for one-component cryoprotective media on the basis of PEO-1500 or DMSO, which eliminates one of the cryodamage factors. It was found that the high-molecular cryoprotectant PEO-1500 plays a crucial role in the development of crystallization of eutectic compositions in combined solutions, preventing crystallization at the temperature characteristic of eutectic water - DMSO. The addition of sucrose to the combined cryopreservation solutions helps to prevent the development of crystallization of eutectic compositions, regardless of the ratio of PEO-1500 and DMSO in the medium.

It was found that the fluorescent dye 3-DAB (3-dimethylaminobenzantrone) effectively dyes the membranes of equine, bovine and rabbit erythrocytes. Under the action of membrane damaging factors of cryopreservation, parts of erythrocytes acquire a looser structure and the number of hydrophobic binding sites of the probe increases, which leads to an increase in the fluorescence of cells with damaged membranes. This makes it possible to successfully use the fluorescent dye 3-DAB in flow cytometric analysis and fluorescence microscopy to assess the condition of erythrocytes of animals after cryopreservation. DMSO-based

one-component cryoprotective medium is not effective enough in cryopreservation of equine erythrocytes and most cells that survive after freezing do not restore their morphological characteristics. Preservation of equine, bovine and rabbit erythrocytes in the combined cryoprotective medium not only reduces the total cell loss compared to the DMSO solution, but also the erythrocytes that survived after all stages of cryopreservation are closer to the control. This is especially important for equine erythrocytes, which are more sensitive to damaging cryobiological factors.

The influence of changes in the concentration of the components of the combined medium on the hemolysis of erythrocytes at different stages of cryopreservation was analyzed for the first time. It was found that a small addition of sucrose to the combined medium can significantly reduce hemolysis of erythrocytes during freezing. The use of DMSO at a concentration in suspension above 5% leads to a significant increase in the level of hemolysis at the incubation stage. Increasing the concentration of PEO-1500 can significantly reduce the level of erythrocyte hemolysis at the stage of freezing - heating. However, there is a sharp increase in the level of hemolysis at the stage of removal of the cryoprotectant. The effectiveness of one-component cryoprotective medium based PEO-1500 could not be evaluated with rabbit erythrocytes, because erythrocyte coagulation was observed when mixed with it. The reduction of the concentration of this cryoprotectant in the combined medium does not lead to coagulation and allows you to successfully preserve rabbit red blood cells. For the first time it was found that the preservation of bovine, equine and rabbit erythrocytes is higher after cryopreservation with combined cryoprotective media than with one-component. A new cryoprotective medium with 15% PEO-1500, 10% DMSO, 5% 1,2-PD and 5% sucrose has been developed, which effectively preserves erythrocytes of bull, horse, rabbit and human during cryopreservation. It has been shown that after freezing in the developed combined medium the hemolysis of bovine erythrocytes is 5.2%, rabbit - 6.4%, equine - 7.2%, and human - 5.9%. After all stages of cryopreservation (incubation with cryoprotective medium, freezing-warming,

cryoprotectant removal procedures and transfer to isotonic medium) the level of hemolysis of erythrocytes increases significantly, but it is possible to obtain from 74.6% to 81.6% of preserved cells, depending on mammalian species.

The lowest index of osmotic fragility was found for rabbit erythrocytes, which may be due to their structural features, as it is known that rabbit erythrocyte membranes contain more phospholipids, less glycolipids and cholesterol than bovine and equine erythrocyte membranes. It can be noted that the index of osmotic fragility of rabbit erythrocytes after all stages of cryopreservation is similar to that of the control group, which indicate their greater osmotic stability. Comparing the effectiveness of one-component medium with DMSO and combined cryoprotective medium, it can be noted that at the stage of incubation with cryoprotectant the osmotic fragility index of bovine, equine and rabbit erythrocytes is lower in the combined medium, which indicates its lower cytotoxicity. After freezing-reheating of bovine erythrocytes, the difference between the indices of osmotic fragility of cells with DMSO and the combined medium is leveled. With rabbit and equine erythrocytes, the index of osmotic fragility of erythrocytes with a combined medium at all stages of cryopreservation is significantly lower than with a one-component medium based on DMSO.

Thus, the use of multicomponent media with a mixture of exo- and endocellular cryoprotectants can reduce the concentration of each of them and, accordingly, the possible toxic effects. In this case, a sufficiently high total concentration of cryoprotective substances in both intracellular and extracellular media is achieved in the cell suspension. This makes it possible to obtain high rates of erythrocyte preservation during cryopreservation in a combined protective media. Significantly higher efficiency of combined cryoprotective media when freezing erythrocyte suspensions may also be associated with their high glass-forming ability, as well as the fact that their use prevents such a factor of cryo-damage as the crystallization of eutectic compositions.

Modeling of studied mammalian erythrocytes transfusion showed that both incubation with a cryoprotective medium and subsequent freezing-warming affect

the condition of erythrocytes and their hemolysis increases significantly. It has been shown that after cryopreservation in a combined cryoprotective medium, the osmotic properties of deconserved mammalian erythrocytes are better and in the simulation of transfusion their hemolysis is lower than with DMSO-based medium. It was found that after incubation stage with the developed combined cryopreservation medium, about 97% of deconserved erythrocytes of bovine, equine, rabbit and human remain preserved after incubation in plasma and saline at 37 °C for 24 hours. Significantly lower levels of hemolysis (2% in plasma) were recorded for rabbit erythrocytes compared to other mammals studied. After all stages of cryopreservation, the level of hemolysis increases significantly compared to the control, but its level remains within 5-6% depending on the type of mammal. But even after all stages of cryopreservation, about 94% of deconserved erythrocytes of the studied mammals remain preserved after incubation in plasma and saline at a temperature of 37 °C for 24 hours. The number of erythrocytes killed in the simulation of transfusion within 24 hours after incubation with DMSO and after all stages of cryopreservation with it is significantly greater than with the combined cryoprotective medium.

Therefore, the conducted scientific researches substantiate expediency of use of the combined cryoprotective media at cryopreservation of mammalian erythrocytes. The obtained results are the basis for the development of technology for low-temperature storage of mammalian erythrocytes with an improved level of cells' preservation of in the process of cryopreservation. The developed cryopreservation medium of 15% PEO-1500, 10% DMSO, 5% 1.2 PD and 5% sucrose has a high efficiency in cryopreservation of erythrocytes of different mammalian species and is the most versatile of the currently studied cryoprotective solutions.

Key words: mammalian erythrocytes, cryopreservation, combined cryoprotective media, low-temperature phase transitions, hemolysis, osmotic fragility.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	18
ВСТУП	19
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	28
1.1 Пошкодження біологічних об'єктів при дії низьких температур та принципи кріоконсервування	28
1.1.1 Механізми кріопошкодження	28
1.1.2 Види кріопротекторів і механізми їх дії	33
1.2 Низькотемпературні фазові переходи у кріобіологічних системах	38
1.2.1 Кристалізація	38
1.2.2 Склування	41
1.2.3 Рекристалізація	44
1.2.4 Плавлення	45
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	48
2.1 Матеріали дослідження	48
2.2 Методи дослідження	49
2.2.1 Диференціальна скануюча калориметрія	49
2.2.2 Визначення рівня гемоліза спектрофотометричним методом	52
2.2.3 Дослідження осмотичної крихкості еритроцитів	52
2.2.4 Моделювання трансфузії еритроцитів	53
2.2.5 Флуоресцентна мікроскопія	53
2.2.6 Цитофлуориметрія	54
2.2.7 Методи статистичного аналізу	55
РОЗДІЛ 3 НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНІ ФАЗОВІ ПЕРЕХОДИ І СКЛУВАННЯ У СУСПЕНЗІЯХ ЕРИТРОЦИТІВ ССАВЦІВ В ПРИСУТНОСТІ КРІОЗАХИСНИХ СПОЛУК	56

3.1 Фазові переходи і склування у кріозахисних середовищах для кріоконсервування еритроцитів при температурах нижче 0°C	56
3.1.1 Низькотемпературні фазові переходи і склування в однокомпонентних кріозахисних середовищах	56
3.1.2 Низькотемпературні фазові переходи і склування у комбінованих кріозахисних середовищах	62
3.2 Фазові переходи у суспензіях еритроцитів ссавців при температурах нижче 0°C	69
РОЗДІЛ 4 ЗБЕРЕЖЕНІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ НА РІЗНИХ ЕТАПАХ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ У ПРИСУТНОСТІ КОМБІНОВАНИХ КРІОЗАХИСНИХ СЕРЕДОВИЩ	77
4.1 Оцінка флуоресцентними методами ефективності комбінування проникального і непроникального кріопротекторів при кріоконсервуванні еритроцитів бика, коня і кролика	77
4.2 Вплив складу кріоконсервуючого середовища на гемоліз еритроцитів ссавців на різних етапах кріоконсервування	90
РОЗДІЛ 5 ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ НА ОСМОТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ ССАВЦІВ	101
5.1 Дослідження осмотичної крихкості еритроцитів ссавців на різних етапах кріоконсервування	101
5.2 Моделювання трансфузії еритроцитів коня, бика, кролика і людини після кріоконсервування у комбінованому і однокомпонентному кріозахисному середовищі	112
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	114
ВИСНОВКИ	120
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	122
Додаток А. Список публікацій здобувача за темою дисертації	
Додаток Б. Відомості про апробацію результатів дисертації	

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ДСК	– диференційна скануюча калориметрія;
ДТА	– диференційний термічний аналіз;
1,2–ПД	– 1,2 – пропандіол;
ПЕО–1500	– поліетиленоксид з молекулярною масою 1500;
ДМСО	– диметилсульфоксид;
3-ДАВ	– 3-диметиламінобензантрон;
Мм	– молекулярна маса;
T	– температура;
T _c	– температура кристалізації при нагріванні;
T _g	– температура склування;
T _m	– температура плавлення;
T _{ce}	– температура кристалізації евтектичних складів;
T _{me}	– температура плавлення евтектичних складів.

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. В останні роки у ветеринарній медицині значно зросла потреба у трансфузіях крові тварин [1 – 4]. Це стосується і маленьких домашніх тварин, таких як коти, собаки, кролі [5, 6, 7], так і великих сільськогосподарських, таких як бики і коні [7 – 9]. Є дані про переливання як цільної крові, так і її компонентів (еритромаси, тромбоконтратів, плазми та ін.) [5, 7, 10, 11]. Однак дослідники сходяться на думці, що для уникнення негативних реакцій після трансфузії перевагу необхідно віддавати переливанню окремих компонентів [3, 10]. Компоненти крові тварин часто застосовуються в ветеринарній лікувальній практиці при отруєннях, надмірній втраті крові, порушеннях імунної системи та ін. [5, 10]. Переливання крові від однієї тварини (донора) до іншої можливо лише після ретельно проведених досліджень, які дозволяють виключити у донора кровопаразитарні та інфекційні захворювання [7, 11]. Пошук тварини-донора з потрібною групою крові та перевірка цієї крові може займати тривалий час, тому для випадків з гострим станом тварин необхідна наявність банків крові [10, 12].

Тривале зберігання компонентів крові тварин можливо за низьких температур в умовах кріобанків. Але еритроцити різних видів ссавців потребують індивідуального підходу до розробки середовищ кріоконсервування. Традиційні для еритроцитів людини кріозахисні середовища на основі гліцерину або 1,2-пропандіолу (1,2-ПД) мають низьку ефективність для еритроцитів бика, коня, котів, собак і кролів [13, 14]. Диметилсульфоксид (ДМСО) має більш високу кріозахисну ефективність по відношенню до еритроцитів деяких тварин, але рівень гемолізу після всіх етапів кріоконсервування досить високий [14]. Тому пошук більш ефективних і універсальних середовищ кріоконсервування для еритроцитів тварин продовжується. Застосування екзоцелюлярних кріозахисних сполук

дозволяє отримати низький гемоліз еритроцитів після розморожування, але високі показники осмотичної крихкості не дозволяють використовувати їх для гемотрансфузій [14, 15]. Виявлено, що для деяких видів біологічних об'єктів більш ефективними є комбіновані кріозахисні середовища, які містять комбінацію ендо- та екзоцелюлярних кріозахисних сполук [13, 16 – 19].

Низькотемпературне консервування включає етап охолодження біологічних об'єктів до температури рідкого азоту, при цьому в них протікає ряд складних фізичних процесів (кристалізація льоду, формування метастабільних станів), здатних викликати певні пошкодження клітинних структур [20 – 22]. Зміни біохімічних показників клітин при охолодженні можуть тривати після кристалізації основної маси розчинника до температури повного тверднення рідкої фази, яка залишилася у склоподібному стані. Тому тривале зберігання біологічних зразків необхідно проводити за температури нижче температури склування зразка. Ця температура може варіюватися в залежності від компонентів кріозахисного середовища, що використовуються при кріоконсервуванні. На даний час не до кінця вивчені фізичні процеси, які протікають при температурах нижче 0 °С в біологічних об'єктах при використанні багатокомпонентних кріоконсервуючих середовищ.

З огляду на вищезазначене доцільним є дослідження низькотемпературних фазових переходів і склування у комбінованих кріозахисних середовищах та суспензіях еритроцитів ссавців, а також оцінка збереженості еритроцитів після кріоконсервування під захистом комбінованих кріозахисних середовищ.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.
Дисертаційна робота виконана на базі кафедри хімії і біохімії Харківської державної зооветеринарної академії та відділу кріобіофізики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України у рамках планових тем: «Експериментальна обробка та розробка методів кріоконсервування клітин та

тканин домашніх та сільськогосподарських тварин, а також розробка методів отримання кріоекстрактів з ембріональних тканин тварин та вивчення їх біологічної активності» (№ державної реєстрації 0110U007535) та «Вплив кріоконсервування плаценти та її водно-сольових екстрактів на антиоксидантну та протизапальну дію екстрактів» (№ державної реєстрації 0116U003491).

Мета і завдання дослідження.

Мета роботи – створити ефективне комбіноване кріоконсервуюче середовище для еритроцитів ссавців (бика, коня і кролика) і дослідити збереженість клітин на етапах кріоконсервування.

Для досягнення поставленої мети передбачалося вирішити наступні *завдання*:

1. Дослідити фізичні процеси в багатокомпонентних кріозахисних середовищах у температурному діапазоні $-196 \div 0^{\circ}\text{C}$. Виявити закономірності впливу різних кріозахисних речовин на температури фазових переходів і склування у комбінованих середовищах.
2. Дослідити низькотемпературні фазові переходи і склування в суспензіях еритроцитів ссавців у присутності багатокомпонентних кріозахисних середовищ. Визначити найбільш перспективні кріозахисні середовища за температурами склування і кількістю утвореної склоподібної фази.
3. Провести порівняльний аналіз збереженості еритроцитів бика, коня і кролика при кріоконсервуванні з однокомпонентними і комбінованими кріозахисними середовищами.
4. Визначити рівень гемоліза еритроцитів бика, коня, кролика і людини на різних етапах кріоконсервування під захистом комбінованих кріозахисних середовищ. Визначити середовище з найменшим рівнем гемолізу для всіх досліджених ссавців.

5. Вивчити осмотичні властивості еритроцитів бика, коня і кролика після кріоконсервування у розробленому комбінованому кріозахисному середовищі.

Об'єкт і предмет дослідження.

Об'єкт дослідження – низькотемпературні фазові переходи, кріопошкодження еритроцитів ссавців.

Предмет дослідження – збереженість еритроцитів бика, коня, кролика і людини в процесі кріоконсервування, температури фазових переходів, зміна теплоємності при склуванні.

Методи дослідження:

- метод ДСК для дослідження низькотемпературних фазових переходів і склування в кріоконсервуючих середовищах та суспензіях еритроцитів ссавців;
- метод флуоресцентної мікроскопії для проведення порівняльного аналізу стану еритроцитів, кріоконсервованих під захистом комбінованих і однокомпонентних кріозахисних середовищ;
- метод проточної цитофлуориметрії для кількісної оцінки ушкоджених еритроцитів при кріоконсервуванні з різними кріопротекторами;
- спектрофотометричний метод для вимірювання рівня гемолізу еритроцитів на різних етапах кріоконсервування;
- методика визначення осмотичної крихкості для вивчення механо - еластичних властивостей мембран еритроцитів в процесі кріоконсервування;
- методика моделювання трансфузії для попередньої оцінки тривалості життя кріоконсервованих еритроцитів після переливання;
- статистичні методи для аналізу отриманих експериментальних даних.

Наукова новизна отриманих результатів.

У дисертаційній роботі *вперше досліджені* фізичні процеси в суспензіях еритроцитів ссавців з комбінованими кріозахисними середовищами при охолодженні до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ та проаналізовано закономірності впливу різних кріозахисних речовин на температури фазових переходів і склування у багатокомпонентних середовищах. Встановлено, що температура склування у комбінованому середовищі знижується при збільшенні концентрації ДМСО і підвищується при збільшенні концентрації поліетиленоксиду з молекулярною масою 1500 (ПЕО-1500) та при додаванні сахарози. Виявлено, що температура склування еритроцитів в комбінованих кріозахисних середовищах, які містять ПЕО-1500, ДМСО, 1,2-ПД і сахарозу підвищується в порівнянні з температурою склування однокомпонентних середовищ на основі ДМСО, що дозволяє розширити діапазон можливих температур зберігання еритроцитів ссавців в цих середовищах.

Уперше показано, що застосування комбінованих кріозахисних середовищ дозволяє уникнути розвитку кристалізації евтектичних складів, характерних при застосуванні в складі кріозахисного середовища тільки ПЕО-1500 або ДМСО, що дозволяє виключити один з факторів кріопошкоджень. Виявлено, що високомолекулярний кріопротектор ПЕО-1500 відіграє вирішальну роль у розвитку кристалізації евтектичних складів у комбінованих розчинах, перешкоджаючи кристалізації при температурі характерній для евтектики вода – ДМСО. Додавання сахарози у комбіновані кріоконсервуючі розчини сприяє запобіганню розвитку кристалізації евтектичних складів незалежно від співвідношення ПЕО-1500 та ДМСО у середовищі.

Уперше проаналізовано вплив зміни концентрації компонентів комбінованого середовища на гемоліз еритроцитів бика, коня, кролика на різних етапах кріоконсервування. Виявлено, що використання ДМСО при концентрації в суспензії вище 5% призводить до достовірного підвищення рівня гемолізу ще на етапі інкубації. Незначна добавка в середовище

сахарози дозволяє істотно зменшити гемоліз еритроцитів при заморожуванні. Підвищення концентрації ПЕО-1500 дозволяє істотно знизити рівень гемолізу еритроцитів на етапі заморожування - відігріву. Однак спостерігається різке зростання рівня гемолізу на етапі видалення кріопротектору.

Уперше встановлено, що збереженість еритроцитів бика, кролика і коня вища після кріоконсервування з комбінованими кріозахисними середовищами, ніж з однокомпонентними. Застосування багатокомпонентних кріозахисних середовищ дозволяє знизити концентрацію кожного з кріопротекторів і, відповідно, токсичну дію, але при цьому отримати досить високу сумарну концентрацію кріозахисних речовин, що дає високі показники збереженості еритроцитів при кріоконсервуванні у комбінованому захисному середовищі.

Розроблено та запатентовано нове кріозахисне середовище з 15% ПЕО-1500, 10% ДМСО, 5% 1,2 ПД і 5% сахарози, яке ефективно зберігає еритроцити бика, коня, кролика і людини в процесі кріоконсервування.

Уперше показано, що після кріоконсервування у комбінованому кріозахисному середовищі осмотичні властивості деконсервованих еритроцитів ссавців кращі і при моделюванні трансфузії їх гемоліз достовірно нижчий, ніж с середовищем на основі ДМСО. Виявлено, що після інкубування з розробленим комбінованим кріоконсервуючим середовищем, близько 97% деконсервованих еритроцитів бика, коня, кролика і людини залишаються збереженими після інкубації в плазмі і фізіологічному розчині при температурі 37 °С протягом 24 годин. Після всіх етапів кріоконсервування рівень гемолізу достовірно зростає, порівняно з контролем, але рівень його залишається в межах 5-6% в залежності від виду ссавців.

Наукова та практична значимість роботи.

Отримані результати є підґрунтям для розробки технології низькотемпературного зберігання еритроцитів бика, коня і кролика з

покращеним рівнем збереженості клітин в процесі кріоконсервування. Проведені наукові дослідження обґрунтовують доцільність використання комбінованих кріозахисних середовищ при кріоконсервуванні еритроцитів ссавців.

Розроблене кріоконсервуюче середовище 15% ПЕО-1500, 10% ДМСО, 5% 1,2 ПД і 5% сахарози має високу ефективність при кріоконсервуванні еритроцитів різних видів ссавців і є найбільш універсальним з досліджених на даний час кріозахисних розчинів.

Підвищення температури склування суспензій еритроцитів бика, коня, кролика і людини при кріоконсервуванні під захистом комбінованого кріозахисного середовища дозволяє розширити діапазон можливих температур зберігання крові, що полегшує практичне застосування розробленої методики кріоконсервування еритроцитів ссавців.

Результати роботи можуть бути використані у курсі лекцій вищих навчальних закладів та як методичні вказівки в лабораторіях, які досліджують властивості еритроцитів після кріоконсервування.

Особистий внесок здобувача.

Дисертація є самостійним і оригінальним науковим дослідженням здобувача. Автором спільно з науковим керівником сформульовано мету та визначено завдання дослідження. Здобувачем отримані експериментальні дані у всіх розділах досліджень, проведена їх статична обробка. Автором роботи самостійно проведено аналіз літератури, проаналізовані отримані дані і зроблені висновки. Спільні публікації відображають результати спільного планування, проведення роботи і обговорення результатів.

Особистий внесок здобувача в опублікованих зі співавторами роботах полягає:

- у роботах [23 – 25] – приготування кріозахисних розчинів та експериментальних зразків суспензій еритроцитів ссавців, дослідження фазових переходів і склування, обробка

калориметричних термограм, аналіз отриманих експериментальних даних;

- у роботах [26 – 28] – приготування експериментальних зразків, обробка і аналіз отриманих експериментальних даних;
- у роботах [29 – 40] – планування експерименту, приготування зразків еритроцитів бика, коня, кролика та людини з кріозахисними розчинами, кріоконсервування зразків крові, моделювання трансфузії, вимірювання гемолізу спектрофотометричним методом, порівняльний аналіз отриманих даних.

Апробація результатів дисертації.

Матеріали дисертаційної роботи представлені на вітчизняних та міжнародних конференціях серед яких:

- 17-й міжнародний симпозіум “EARCR” (Milano, Italy, 23-27 April 2009);
- VI Міжнародна наукова конференція «Молодь і поступ біології» (м. Львів, Україна, 21–24 вересня 2010 р.);
- 17-а міжнародна Пущинська школа - конференція молодих учених «Биология – наука XXI века» (м. Пушино, Росія, 21 – 26 квітня 2013 р.);
- Міжнародна конференція молодих вчених «Экспериментальная и теоретическая биофизика» (м. Пушино, Росія, 2015 р.);
- 40-а щорічна конференція молодих вчених «Холод в біології та медицині» (м. Харків, Україна, 23-24 травня 2016 р.);
- Міжнародна конференція «European Research Area: Status, Problems and Prospects » (м. Рига, Латвія, 1-2 вересня 2016 р.);
- XI Зоологічна Міжнародна науково-практична конференція «Актуальные проблемы зоологической науки в Беларуси» (м. Мінськ, Білорусь, 1-3 листопада 2017 р.);

- 41-а щорічна конференція молодих вчених "Холод в биологии и медицине. Актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии" (м. Харків, Україна, 24-25 травня 2017 р.);
- 42-а щорічна конференція молодих вчених «Холод в біології та медицині» (м. Харків, Україна, 23-24 травня 2018 р.);
- 43-я щорічна конференція молодих вчених «Холод в біології та медицині» (м. Харків, Україна, 27-29 травня 2019 р.);
- II Всеукраїнська науково-практична конференція «Стратегії інноваційного розвитку природничих дисциплін: досвід, проблеми та перспективи» (м. Кропивницький, Україна, 21 березня 2019 р.);
- 57-і щорічні збори Товариства криобіології “Cryo 2020” (Virtual annual meeting, USA, 21-23 July 2020).

Публікації.

За результатами отриманих у дослідженні даних опубліковано 20 наукових робіт: 2 статті у закордонних наукових журналах, 5 статей у наукових журналах України (1 входить до міжнародної наукометричної бази Scopus), 2 статті у збірниках матеріалів конференцій (загалом 2 наукові статті мають ідентифікатор DOI), 1 патент України на корисну модель, 10 тез доповідей.

Структура дисертації.

Матеріали дисертації викладені на 141 сторінках друкованого тексту, з яких 102 сторінки основного змісту.

Дисертація складається з анотації, вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали і методи дослідження», 3 розділів з результатами власних досліджень, узагальнення результатів, висновків і списку використаних джерел літератури. До списку літератури входять 171 джерело, у тому числі 113 зарубіжних, розміщених на 20 сторінках тексту. Робота ілюстрована 33 рисунками (з яких 4 мікрофотографії) і 9 таблицями.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Пошкодження біологічних об'єктів при дії низьких температур та принципи кріоконсервування

1.1.1 Механізми кріопошкодження

Замерзання води з утворенням льоду є головною причиною більшості механізмів кріопошкодження біологічних об'єктів [41]. Лід, який утворюється, є по суті чистою кристалічною водою, що практично не містить розчиненої речовини: розчинені речовини разом із клітинами концентруються в решті рідкої фази, яка поступово зменшується по мірі зниження температури та продовження охолодження [42]. Клітина регулює внутрішню концентрацію води та проникальних розчинених речовин так, щоб вона знаходилася в рівновазі з позаклітинним середовищем [43]. Це призводить до того, що клітини реагують осмотичною дегідратацією на осмотичну дезеквілібрацію, спричинену зародженням та зростанням позаклітинного льоду [44]. Кінетика цієї реакції залежить від ряду факторів, включаючи швидкість охолодження, проникальність клітинної мембрани для води та співвідношення поверхні/об'єму клітин. Якщо швидкість охолодження буде досить повільною, клітина продовжить відновлювати осмотичну рівновагу через рух води з клітини, і внутрішньоклітинне середовище залишиться вільним від льоду (рис. 1.1.1.1). Однак, якщо швидкість зміни температури є висока, або проникальність клітини, співвідношення поверхня/об'єм недостатні, щоб дозволити компенсаційний рух води з клітини, внутрішньоклітинна вода переохолоджується нижче точки її замерзання, і клітина відновить рівновагу із зовнішнім середовищем **внутрішньоклітинною кристалізацією** [45 – 47]. Наслідки обох цих шляхів до відновлення осмотичної рівноваги можуть завдати шкоди клітині [20].

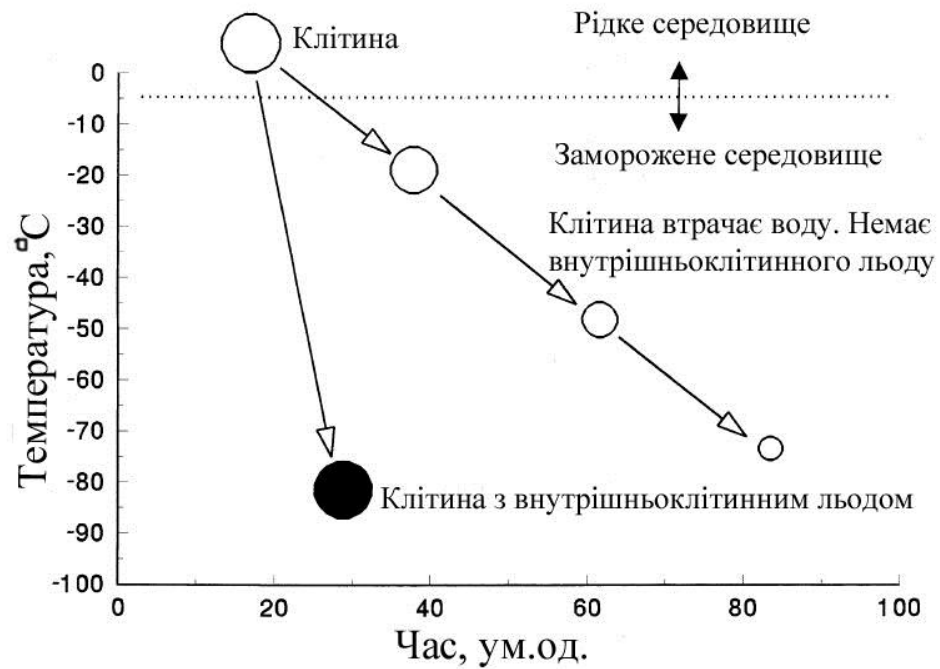


Рис. 1.1.1.1 Схематичне зображення клітини, що охолоджується швидко, і кристалізується всередині або досить повільно втрачає воду і уникає внутрішньоклітинного льоду [48].

Концентрація позаклітинного розчину з кристалізацією води зростає до досягнення евтектичної температури, при якій залишок розчинника та розчиненої речовини кристалізуються разом. Для хлориду натрію ця температура становить $-21,1\text{ }^{\circ}\text{C}$, а евтектична суміш при цьому містить 31% NaCl [49]. Тому при повільному охолодженні, навіть без появи внутрішньоклітинного льоду, можливо пошкодження клітин, яке буде пов'язане з підвищенням концентрації розчинених речовин [50]. **Гіперконцентрація солей** може негативно впливати на стабільність білків і ліпідів мембран.

Merzhan N.T. [51] дійшов висновку, що концентрування внутрішньоклітинної солі не може мати вирішального значення в пошкодженні клітин в процесі їх зневоднення і висловив **гіпотезу мінімального об'єму**, яка припускає, що причиною пошкодження може бути зменшення об'єму клітини до критичної мінімальної позначки.

Осмотичне видалення води з цитоплазми призводить до накопичення внутрішньоклітинних розчинних речовин та збільшення щільності упаковки макромолекул [52], що може призводити до їх **денатурації**.

При повільному охолодженні значну дію, що пошкоджує клітини також відіграють **механічні і гіпербаричні фактори**. Так, клітини можуть захоплюватися зростаючими кристалами льоду і пошкоджуватися в результаті роздавлювання або механічного пошкодження гострими кристалами льоду [44]. Частина клітин, захоплених в кристал льоду, виявляється в замкнутому просторі, де вони піддаються гіпербаричній дії.

Для деяких видів клітин виявлено «**ефект упаковки**», тобто посилення пошкодження клітин при збільшенні їх концентрації у суспензії [48]. Так, гемоліз еритроцитів у розчині гліцерину після заморожування-відігрівання значно залежав від гематокриту, коли гематокрит був більше ніж 50%.

Мембрани клітин вельми чутливі до **величини рН**, яка може змінюватися в рідких мікрофазах крижаних каналців при заморожуванні [53], тому при приготуванні кріоконсервантів часто використовують буферні розчини.

У середовищі з електролітами треба враховувати можливу наявність **електростатичних ефектів** при заморожуванні з низькими швидкостями. Електричне поле виникає у результаті взаємодії іонів з фронтом кристалізації, при цьому на межі фаз формується подвійний електричний шар, який викликає появу різниці потенціалів між твердою і рідкою фазами [54]. При контакті з клітинами може виникати електричний пробій плазматичної мембрани та ініціювання внутрішньоклітинної кристалізації.

Клітинні мембрани є ефективними бар'єрами для росту льоду, а в цитоплазмі мало ефективних нуклеаторів, здатних призвести до гетерогенного зародкоутворення вище $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ [55], що призводить до дискусії про механізм, за яким може відбуватися внутрішньоклітинне зародження кристалів льоду при більш високих температурах. Переважають три гіпотези, всі вони враховують роль плазматичної мембрани у внутрішньоклітинному

утворенні льоду. Гіпотеза про мембранну пору передбачає висівання внутрішньоклітинного льоду через попередньо наявні водні пори в мембрані [56]. Водні канали (відомі як аквапорини) були знайдені у деяких, але далеко не у всіх типах клітин, тоді як теорії дифузії молекул води та розчинених речовин через мембрани постулюють перехідне утворення порожнин у біолої, що може забезпечити шлях розповсюдження кристалів льоду через мембрану [57].

Пошкодження плазматичної мембрани під час замерзання як причина, а не наслідок появи внутрішньоклітинного льоду було запропоновано на основі експериментальних спостережень у рослинних протопластах [58, 59], де розрив протопласта безпосередньо спостерігався до того, як відбулося внутрішньоклітинне утворення льоду. У цій гіпотезі осмотичної пори [60] в плазматичній мембрані утворюються пори як наслідок теплових коливань під час охолодження. Такі пори можуть виникати також під **впливом дегідратації** при повільному охолодженні [54]. Зневоднення клітин може призводити до поділу ліпідних і ліпопротеїнових фаз, втрати бар'єрних властивостей мембран через формування в них трансмембранних дефектів, через які відбувається втрата внутрішньоклітинної води, іонів і малих біомолекул. Пори можуть бути розширені під час великого потоку води, викликаного швидко зростаючим осмотичним дисбалансом між позаклітинним та внутрішньоклітинним середовищем. Пори згортаються після зменшення потоку води, але за наявності позаклітинного льоду вони можуть дозволити ініціювати кристалізацію переохолодженого внутрішньоклітинного середовища позаклітинним льодом.

Третя теорія внутрішньоклітинної кристалізації передбачає, що плазматичну мембрану не потрібно порушувати, щоб каталізувати внутрішньоклітинне зародження льоду [61]. Гетерогенне зародження відбувається внаслідок локалізованих топографічних змін плазматичної мембрани, які відбуваються внаслідок дії позаклітинного льоду на компоненти мембрани.

Внутрішньоклітинне утворення льоду може механічно порушувати мембрани, однак механічні пошкодження аж ніяк не є єдиною формою пошкодження клітин. Інші механізми включають тепловий шок [58], осмотичну травму [62], денатурацію білка [59] та утворення газових міхурів [63]. Внутрішньоклітинний лід може бути нешкідливим і навіть захисним при певних обставинах. Той факт, що клітини, які швидко охолоджуються, можуть пережити наявність внутрішньоклітинного льоду, якщо його швидко нагріти, говорить про те, що внутрішньоклітинний лід сам по собі не є незмінним летальним явищем, скоріше кількість льоду, розмір кристалів [64, 65], його розташування [66] та механізм утворення [56] є причинами будь-яких клітинних пошкоджень.

Аналіз збереженості клітин після замерзання та відтавання та вплив швидкості охолодження привели Мазура до формулювання того, що стало відоме як «**двофакторна гіпотеза**» кріопошкодження [66, 67]. Дієвість цієї гіпотези було підтверджено у ряді досліджень [67, 68]. Важливо зазначити, що у клітинній популяції з проміжною швидкістю охолодження відбудеться змішана реакція: деякі клітини досягають осмотичної рівноваги втратою води, а інші - внутрішньоклітинним утворенням льоду. Відповідно, і механізми пошкодження у різних клітинах в суспензії можуть бути різними.

"Двофакторна гіпотеза" значною мірою була розроблена з клітинами ссавців, і в багатьох випадках існує хороша кореляція між збереженістю після відтавання, внутрішньоклітинним утворенням льоду та осмотичною дегідратацією під час охолодження [42, 57].

Двофакторна гіпотеза визначає умови, за яких відбувається внутрішньоклітинне утворення льоду, однак не дає інформації про фізичний стан внутрішньоклітинного середовища у сильно стислих клітинах, у яких внутрішньоклітинний лід відсутній. Дослідження внутрішньоклітинної вітрифікації, що досягається високою концентрацією розчиненої речовини та швидким охолодженням, виявили згубний вплив низької швидкості

нагрівання, яка призводила до девітрифікації (кристалізації з аморфної фази) та утворення внутрішньоклітинного льоду на етапі нагріву [69, 70].

Частина пошкоджень клітин може бути зовсім не пов'язана з явищами кристалізації. Так, деякі чутливі до зміни температури клітини гинуть при швидкому охолодженні в області позитивних температур. Таке явище називається **температурним або холодовим шоком** [71, 72].

Повернення клітин в ізотонічний розчин після контакту з гіпертонічним середовищем часто призводить до руйнування їх мембран. Це явище називається **постгіпертонічним лізисом** [73, 74]. Воно трапляється, якщо в гіпертонічному середовищі всередину клітин проникає досить велика кількість розчинених речовин, а при перенесенні в ізотонічні умови всередину клітин проникає значно більше води, ніж її було видалено на стадії зневоднення, перш, ніж концентрація розчинених всередині клітин речовин зменшиться до ізотонічної. При цьому мембрани розтягуються до такої міри, що настає їх механічне пошкодження або порушення їх бар'єрно-транспортної функції. Постгіпертонічний лізис залежить від середовищ дегідратації і регідратації, тривалості інкубування на етапі дегідратації клітин та температури [75].

Таким чином, при повільному охолодженні на клітини діє ряд кріопошкоджуючих факторів, таких як, дегідратація, гіперконцентрація солей, зміна рН, електростатичні ефекти, механічні і гіпербаричні фактори та ін. Головні кріопошкодження клітин при швидкому охолодженні обумовлені зростанням внутрішньоклітинних кристалів льоду і процесами рекристалізації.

1.1.2 Види кріопротекторів і механізми їх дії

Для захисту клітин від пошкоджуючої дії низьких температур використовують кріопротектори [20, 41]. Усі кріозахисні сполуки можна розділити на дві групи залежно від їх здатності проникати крізь плазматичну мембрану. Перші, ендоцелюлярні або проникальні, в основному включають

органічні розчинники, такі як гліцерин, ДМСО, 1,2-ПД, етиленгліколь [44, 76]. Проникальність цих кріопротекторів, як правило, визначається градієнтом концентрації та властивостями мембран. Проникальні кріопротектори надають клітинам внутрішньоклітинний захист, знижують концентрацію електролітів і запобігають зменшенню об'єму клітин у гіпертонічному розчині [49].

Властивість проникальних кріопротекторів модифікувати процеси кристалізації обумовлено їх низькою молекулярною вагою і здатністю до колігативної дії [77]. У частково замороженому розчині загальна концентрація розчинних речовин у незамерзлій фракції фіксована і не залежить від природи розчинених речовин. Оскільки руйнівний вплив солей безпосередньо пов'язаний із концентрацією, зниження цієї концентрації шляхом заміни частини розчинених усередині клітини речовин на кріозахисні сполуки призведе до їх меншого пошкодження [41]. Таким чином, проникальні кріопротектори знижують кріоскопічну температуру замерзання розчину, зменшують кількість утвореного льоду, а також діють як вторинний розчинник для солей [78].

Якщо ендоцелюлярний кріопротектор не може дифундувати з клітини досить швидко під час відтавання, щоб запобігти надмірному припливу вільної води та набряку клітини, може виникнути осмотичний шок, що призведе до розриву клітин через надзвичайно низьку внутрішню еластичність ліпідного біслою [48]. Регідратація при високих температурах, при яких мембрана перебуває у рідкому стані, менш небезпечна, ніж при низьких температурах, при яких спостерігається гелевий стан мембрани.

Багато проникальних кріопротекторів виявляють цитотоксичність та мають погану біосумісність, що може викликати пошкодження клітин в процесі кріоконсервування або серйозні побічні ефекти у пацієнтів, якщо кріопротектор було не повністю видалено з клітин [44, 79, 80]. У порівнянні з цим, непроникальні (екзоцелюлярні) кріопротектори забезпечують лише позаклітинний захист. До них відносяться природні нетоксичні вуглеводи

(такі як сахароза, трегалоза, манітол, лактоза) та біомакромолекули (такі як білки та полімери) [81]. Непроникальні кріопротектори, такі як ПЕО, полівінілпіролідон, гідроксиетильований крохмаль активізують втрату води клітиною і зменшують ймовірність виникнення внутрішньоклітинної кристалізації у процесі швидкого охолодження.

Непроникальні кріопротектори перешкоджають внутрішньоклітинній кристалізації за декількома шляхами [41]. По-перше, вони утворюють оболонку навколо плазматичної мембрани клітини, з однієї сторони стабілізуючи мембрану, а з іншої сприяючи формуванню дрібнокристалічних форм льоду, які не чинять руйнуючої дії на клітину [82]. Реалізація цього механізму можлива в результаті того, що з початком заморожування концентрація полімерних молекул збільшується і шар води між молекулами полімеру стає дуже тонким. Висока в'язкість таких сполук може пригнічувати зародження льоду під час охолодження, але можлива рекристалізація під час нагрівання [83]. По-друге, володіючи осмотичними властивостями, вони викликають дегідратацію клітин і їх стиснення. Тому непроникальні в клітку полімери виявляються такими ж ефективними кріопротекторами, як і проникальні сполуки, і виступають у ролі сольового буферу і пасиватору гетерогенного зародкоутворення кристалів льоду. Додаткова захисна дія деяких кріопротекторів (гліцерин, цукри) полягає у запобіганні частковій денатурації білків у заморожуваному розчині та евтектичній кристалізації.

Сучасні дослідження показали, що кріопротектори можуть мати кріозахисну дію не тільки перешкоджаючи утворенню внутрішньоклітинного льоду, а й модифікуванням мембран, завдяки чому мембрани стають більш стійкими до внутрішньоклітинної кристалізації [84]. Так, виявлено, що ДМСО та етиленгліколь модулюють властивості плазматичних мембран, впливаючи на рухливість ліпідів, допомагаючи клітині пережити розвиток внутрішньоклітинної кристалізації.

Деякі криозахисні сполуки можуть проявляти при заморожуванні змішану дію, виявляючи властивості і проникальних, і непроникальних криопротекторів [85]. До них відносяться ПЕО-400, гексаметиленгидроксиетилмочевина, оксиетильований гліцерин з молекулярною масою до 1400 [79].

Як правило, непроникальні криопротектори поєднують з проникальними для забезпечення як позаклітинного, так і внутрішньоклітинного захисту [44]. Це призводить до компромісу між високою ефективністю криоконсервації та токсичністю криопротекторів [86]. Зокрема, показано, що гідроксиетильований крохмаль у поєднанні зі зниженими концентраціями ДМСО є ефективним для криоконсервації повільним охолодженням [87]. Різні комбінації криопротекторів, а також використання позаклітинних добавок успішно застосовувались при криоконсервуванні багатьох клітин і тканин, включаючи ембріони, пуповинну кров та мезенхімальні стовбурові клітини, отримані з амніону [88].

Виявлені видові специфічні відмінності дії криопротекторів на різні клітини, що говорить про необхідність індивідуального підходу при їх криоконсервуванні [49]. Ці відмінності обумовлені мембранною проникальністю, відношенням поверхні до об'єму, а також метаболічними та функціональними особливостями клітин [41]. Токсична дія криопротекторів [79] може бути пов'язана з взаємодією з клітинною мембраною. Так, молекули криопротектору починають взаємодіяти з клітинною мембраною при кімнатній температурі, змінюючи конформацію інтегральних білків [89 – 91].

Методи криоконсервування поділяють на дві основні групи за швидкостями охолодження: повільне охолодження та вітрифікація [41, 92]. Ці методи потребують різного підходу при підборі криопротекторів. Порівняльна характеристика цих двох методів наведена у таблиці 1.1.2.1. Випадки, коли при нагріванні засклованого при охолодженні криозахисного розчину спостерігається кристалізація, а для збереженості клітин при

кріоконсервуванні у такому розчині вирішальну роль грає швидкість нагрівання, називають кріоконсервуванням нерівноважною вітрифікацією [41]. При цьому високими швидкостями охолодження у присутності кріопротекторів вдається запобігти як зародженню, так і зростанню кристалів льоду і досягти склування зразка [93]. Однак досягнутий склоподібний стан є метастабільним, і для того, щоб система залишалася без льоду, швидкість нагрівання набуває вирішального значення, оскільки при високих швидкостях система зможе обійти зони зародження та зростання кристалів льоду. Високі концентрації кріопротекторів дозволяють досягти рівноважного склування, при якому не розвивається кристалізація при зміні швидкості охолодження чи нагрівання [41].

Таблиця 1.1.2.1

Порівняння методів повільного заморожування та вітрифікації [92]

Характеристика	Метод кріоконсервування	
	Повільне заморожування	Вітрифікація
Робочий час	Більше 3 год	Менше 10 хв
Вартість	Висока, потрібне обладнання для заморожування	Низька, обладнання не потрібне
Об'єм зразка, мл	100-250	1-2
Концентрація кріопротектору	Низька	Висока
Ризик пошкодження заморожуванням, зокрема кристалами льоду	Високий	Низький
Збереженість після відігрівання	Висока	Висока
Ризик токсичного пошкодження кріопротектором	Низький	Високий

Таким чином, треба враховувати, що при кріоконсервуванні методом нерівноважної вітрифікації, який найчастіше використовують у практиці, коли зменшення концентрації кріопротекторів до безпечного для клітин рівня компенсують високими швидкостями охолодження, можливе пошкодження клітин за рахунок девітрифікації та зростання льоду на етапі нагрівання.

Тому цей метод потребує ретельного експериментального підбору швидкостей охолодження та нагрівання при розробці протоколів кріоконсервування.

1.2 Низькотемпературні фазові переходи у кріобіологічних системах

Відомо, що збереженість клітин при кріоконсервуванні залежить від параметрів, що характеризують умови кріоконсервування: швидкості охолодження і нагрівання, глибини охолодження, наявності льоду, температури тощо [41, 42, 48, 57]. Використання кріопротекторів і швидке охолодження перешкоджає кристалоутворенню та дозволяє отримати середовище заморожування в склоподібного стані, проте в такій системі при нагріванні охолоджених зразків може розвиватися кристалізація з переохолодженого стану [52, 70, 94]. Тому дослідження фазового стану при охолодженні кріобіологічних систем є важливим етапом розробки технологій кріоконсервування біологічних об'єктів [47]. Основними фазовими переходами, які протікають при охолодженні та послідуєчому нагріванні кріобіологічних зразків є кристалізація, склування, рекристалізація та плавлення.

1.2.1 Кристалізація

Фізичний стан води, найпоширенішої речовини в живій природі, вважається ключовим фактором успішної кріоконсервації біологічних об'єктів [47, 95], а процеси кристалоутворення в біологічних системах лежать в основі цілого ряду механізмів кріопошкоджень [41, 44, 96]. Очищена вода виявляє цікаві аномалії, що виявляються у 16 відомих кристалічних структурах льоду (більше, ніж у будь-якої іншої речовини) та декількох аморфних твердих станах [95]. Охолоджуючись при атмосферному тиску, вода може кристалізуватися до шестикутного або кубічного льоду залежно від швидкості охолодження.

Розглянемо переохолоджену воду при температурі T , на кілька градусів нижче температури рівноважного замерзання (плавлення) T_m . Якщо вода чиста і об'єм малий, то такий нерівноважний переохолоджений стан може існувати майже безмежно довго. Щоб виникли умови для кристалізації, молекули води при броунівському русі повинні прийняти льодоподібну конфігурацію. Імовірність такого процесу одночасно у всьому масивному зразку зникаюче мала. Однак локальні кластери молекул із льодоподібною структурою у безперервний спосіб утворюються і розпадаються. Якщо одне з таких ядер досягає критичного розміру, то виникають енергетично сприятливі умови для наростання інших молекул води на цих ядрах і лід прогресивно поширюється всередині зразка [41]. Таке спонтанне зростання кристалів, яке повинно супроводжуватися зменшенням їх вільної енергії, відбувається при температурах нижче T_m і тільки для тих зародків, розміри яких перевищують деяку критичну величину $R_{кр}$. Розмір критичного радіусу для гомогенної нуклеації [97]:

$$R_{кр} = 2\sigma T_m / \Delta H \Delta T,$$

де $R_{кр}$ - радіус сферичного зародка, σ - коефіцієнт поверхневого натягу на межі розділу "тверде тіло - рідина", T_m - температура плавлення, H - ентальпія фазового переходу, ΔT - переохолодження.

Тобто кристалізація відбувається у два етапи: утворення зародків кристалів (нуклеація) і подальше зростання цих зародків шляхом приєднання молекул з рідини (зростання кристалу) [49]. Процес кристалізації протікає з виділенням енергії у вигляді прихованої теплоти кристалізації і відноситься до фазових переходів першого роду. Розташування частинок в кристалі впорядковано, і його ентропія набагато менше ентропії розчину.

Зародки можуть утворюватися в результаті гетерофазної флуктуації (гомогенне зародкоутворення), як описано вище, або кристалізація може

відбуватися на сторонніх частинках в розчині (гетерогенне зародкоутворення) [41]. Гомогенне зародження кристалів є порівняно малоюмовірною подією, за винятком температур, близьких до $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Гетерогенне (або полегшене) зародження кристалів каталізується за допомогою відповідної твердої або рідкої поверхні, яка спонукає молекули води утворювати структури, що сприяють кристалізації льоду [49]. На практиці під час кріоконсервації клітин зародження індукується при температурі значно вище $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ і носить гетерогенний характер [98]. Імовірність нуклеації залежить від ступеню переохолодження ($\Delta T = T_m - T$), об'єму охолоджуваного зразка та в'язкості рідини.

Швидкість кристалізації визначається, по-перше, швидкістю виникнення центрів кристалізації, і, по-друге, лінійною швидкістю росту кристалів, тобто швидкістю переміщення межі між закристалізованою масою і розчином. Було відмічено, що повільна швидкість охолодження кріобіологічних систем призводить до зростання позаклітинних, великих, гострих кристалів льоду, а значні темпи заморожування сприяють утворенню дрібних кристалів всередині і зовні клітин [96]. Лід, який утворюється, є по суті чистою кристалічною водою, що практично не містить розчиненої речовини: розчинені речовини разом з клітинами концентруються в решті рідкої фази, яка поступово зменшуватиметься в міру зниження температури та продовження замерзання.

Рідкий розчин на відміну від чистої рідини не твердне цілком при постійній температурі (рис. 1.2.1.1). При деякій температурі початку кристалізації, починають виділятися кристали розчинника; саме температура початку кристалізації є кількісною характеристикою процесу кристалізації з розчинів. Оскільки при кристалізації розчинника концентрація розчину зростає, кристалізація наступних порцій розчинника відбувається при більш низькій температурі [41, 49].

Кристалізація може протікати не тільки на етапі охолодження, але і на етапі нагріву [52, 70, 94]. Останній випадок спостерігається при швидкості

оохолодження вище критичної, що дозволяє уникнути кристалізації при оохолодженні і перевести систему в метастабільний стан, але швидкість нагріву нижче критичної дозволяє системі кристалізуватися.

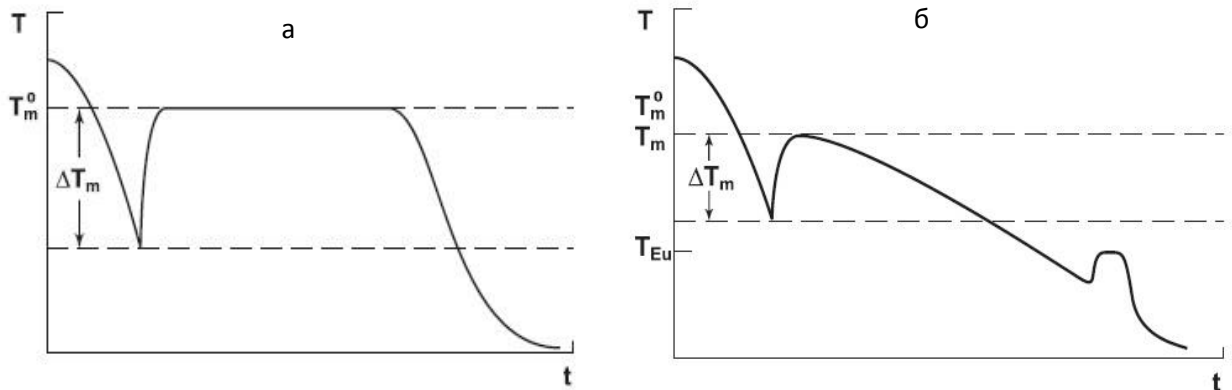


Рис. 1.2.1.1 Заморожування чистої води (а) і розчину (б) [49].

При дослідженні фазових переходів, зокрема кристалізації, широко застосовують метод диференційної скануючої калориметрії (ДСК) [95, 99, 100]. Однак треба враховувати, що швидкість нагріву впливає на реєстрацію фазових переходів у калориметричних дослідженнях. Так, при високих швидкостях деякі фазові переходи можуть не бути зареєстровані через накладання декількох термічних ефектів [101].

1.2.2 Склування

Коли рідина оохолоджується, в'язкість зростає. Якщо рідина оохолоджується дуже швидко, в'язкість може стати такою великою, що молекулярна реорганізація відбувається досить повільно або припиняється. Нуклеація і зростання кристалів затримуються і рідина стає стабільною нерівноважною фазою, яка аморфна (тобто в ній відсутній дальній порядок), у якій, проте, механічні властивості такі, як у твердого тіла [41]. Така фаза називається склом або склоподібним твердим тілом, а процес його формування – склуванням [102].

Процес переходу від рідкого до склоподібного стану можна розуміти на молекулярному рівні як втрату обертальної та поступальної ступенів

свободи протягом певного часового інтервалу, при цьому залишається лише коливальна рухливість у межах фіксованої молекулярної структури. Зменшена свобода молекулярного руху призводить до зниження теплоємності у склі у порівнянні з рідким станом. Хоча дифузія практично не існує нижче температури склування, невеликі локальні рухи молекул, пов'язані з релаксацією, мають наслідки для кріобіології [103].

Як було сказано вище, склування, або вітрифікація - це процес, при якому зразок твердне без утворення кристалів льоду, внаслідок чого утворюється склоподібний аморфний стан. Цей процес вимагає високої в'язкості рідини, високих швидкостей охолодження та/або малого об'єму зразка [104]. Зв'язок між цими трьома факторами пояснюється рівнянням Арава [105]:

$$P = \nu \times \eta / V,$$

де P - вірогідність вітрифікації, ν - швидкість охолодження або нагрівання, η - в'язкість, а V - об'єм.

Склування зазвичай пов'язане з раптовою зміною щільності, що може призвести до значного механічного впливу і розтріскування. Теоретично вітрифікація не має жодного характерного для кристалізації шкідливого впливу. Однак вода може швидко кристалізуватися після переходу зі склоподібного до стану переохолодженої рідини [94].

Визначення точної температури склування є складною процедурою, найчастіше для її вимірювання використовують метод диференційної скануючої калориметрії [106, 107]. Склування відбувається в деякому інтервалі температур. Як правило, температура склування T_g визначається як точка перегину на кривій залежності теплоємності від температури. Температура склування не є термодинамічним параметром, а скоріше відображенням дифузійної динаміки, пов'язаної зі зміною в'язкості при зниженні температури, яка викликана значними структурними змінами [104].

Температура склування може залежати від методики, що використовується для її визначення, і навіть використання однієї техніки може призвести до різних значень T_g , залежно від швидкості охолодження [108]. Отже, не дивно, що часто отримують невеликі відмінності в значеннях T_g , визначених експериментально при різних швидкостях охолодження або різними методами. Наприклад, є грубе «практичне правило», зміна швидкості охолодження на один порядок викликає зміну T_g на 3-5 К. Отже, при повідомленні значення T_g важливо надавати точні умови, при яких утворилася аморфна тверда речовина, і умови, при яких досліджується склування.

Процеси склування методом калориметрії досліджено у водних розчинах в умовах вузьких пор [109]. Виявлено, що для обмежених зразків із евтектичним складом температура склування зростає зі зменшенням розміру пор. Для найменшого діаметру пор (2 нм) температури початкової та кінцевої точок склування збільшуються, відповідно, на 2 та 5 К, що еквівалентно ефекту тиску близько 100 МПа на об'ємний зразок. Можна припустити, що це пов'язане з подвійним утриманням розчину між стінкою пор та осадженим льодом.

Zhao L.S. зі співавторами було досліджено залежність T_g водних розчинів кріопротекторів від вмісту у них води [110]. Виявлено, що розчини зі змінним вмістом води, і, відповідно, концентрацією кріопротектору, можуть бути поділені на три окремі групи залежно від поведінки склування. У розчинах першої групи (з великим вмістом води) наряду зі склуванням має місце кристалізація води на етапі охолодження, температура склування не залежить від концентрації розчину. Для другої (середній концентраційний діапазон) і третьої (висока концентрація розчиненої речовини) груп розчинів гліцерину і 1,2,4-бутантриолу було виявлено повне склування зразків навіть при помірних швидкостях охолодження. Показано, що у другому концентраційному діапазоні температура склування підвищується при

збільшенні концентрації гліцерину або 1,2,4-бутантриолу, а на етапі нагріву заморожених розчинів вище температури T_g можлива кристалізація льоду.

У роботі [111] також виявлено вплив вмісту вологи на температуру склування сумішей цукрів (трігалози або рафінози), полімерів (полівінілпіролідону), проникальних кріопротекторів (етиленгліколь, пропіленгліколь або диметилсульфоксид). Методом диференційної скануючої калориметрії показано підвищення T_g зі зменшенням вмісту вологи.

1.2.3 Рекристалізація

Структура кристалів в розчині після швидкого охолодження є недосконалою, тому при нагріванні відбувається реорганізація структури кристалів - рекристалізація, що представляє собою процес зростання одних кристалічних зерен полікристала за рахунок інших [112, 113].

Виявлено, що рекристалізація може впливати більш згубно, ніж кристалізація на етапі охолодження [95]. Процеси рекристалізації залежать як від типу кріопротектору і його концентрації, так і від режимів охолодження та нагріву. Так, у роботі [99] вивчено взаємодію між швидкістю охолодження та швидкістю нагрівання та їх вплив на життєздатність і функцію Т-клітин, кріоконсервованих у розчині ДМСО. Отримані дані показують, що за умови, коли швидкість охолодження становить $1\text{ }^\circ\text{C/хв}$ або повільніше, фактично немає впливу швидкості нагрівання на життєздатність клітин в межах досліджуваних швидкостей нагрівання (від $1,6\text{ }^\circ\text{C/хв}$ до $113\text{ }^\circ\text{C/хв}$). Після швидкості охолодження $10\text{ }^\circ\text{C/хв}$ спостерігалось зменшення числа життєздатних клітин при повільних темпах нагрівання ($1,6\text{ }^\circ\text{C/хв}$ та $6,2\text{ }^\circ\text{C/хв}$). Кріомікроскопічні дослідження показали, що втрата життєздатності клітин корелює з розвитком процесу рекристалізації. Швидкі темпи нагрівання ($113\text{ }^\circ\text{C/хв}$ і $45\text{ }^\circ\text{C/хв}$) не призводили до розвитку цього процесу.

Вплив швидкостей охолодження та нагрівання, а також концентрації ДМСО на життєздатність лейкоцитів людини досліджено Wang M. зі

співавторами [70]. Виявлено що після повільного охолодження ($2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{хв}$) у 5% розчині ДМСО тільки висока швидкість нагрівання дає високий рівень життєздатності клітин після відтавання, що може пояснюватися уникненням процесів рекристалізації при швидкому відігріванні.

Рекристалізація у деяких розчинах кріопротекторів може протікати у декілька етапів. Так, при дослідженні кристалізації води в концентрованому водному розчині поліетиленгліколю з вмістом води 37,5 мас.% методами інфрачервоної спектроскопії та диференціальної скануючої калориметрії показано розвиток рекристалізації льоду у два етапи: при 198 К та при 210 К [114].

Для запобігання шкідливої дії процесів рекристалізації дослідники продовжують пошуки інгібіторів рекристалізації, до яких, зокрема, відносяться антифризні білки і глікопротеїни [115, 116], деякі моно- та дисахариди [117], а також спеціально синтезовані маленькі проникальні у клітини молекули [112, 118].

1.2.4 Плавлення

Плавленням називається перехід речовини з твердого кристалічного стану в рідкий. Плавлення є фазовим переходом першого роду і супроводжується поглинанням тепла [119]. Головними характеристиками такого переходу речовин є температура і ентальпія плавлення [120]. Плавлення можна розглядати як процес, зворотний кристалізації. Він характеризується оборотною рівновагою між двома окремими фазами і призводить до утворення рідкої фази. Плавленню передують інтенсивне разупорядкування кристалів речовини (так зване передплавлення) і поява рідких мікроділянок на поверхні кристалів і поблизу міжкристалічних кордонів. При нагріванні мікроділянки укрупнюються і зливаються, формуючи рідку фазу, а кристали розсипаються на фрагменти і зменшуються в розмірах до повного зникнення. Теплота, що підводиться до речовини при

плавленні, витрачається в основному на розрив міжатомних зв'язків, а не на її нагрівання. Якщо склад речовини, що плавиться, не змінюється, плавлення називається конгруентним, якщо змінюється - інконгруентним [121]. Температура плавлення T_m подвійної системи залежить від її складу [120].

Температура плавлення чистого льоду $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, а розчинені у воді речовини призводять до зниження цієї температури [100]. Однак, виявлено, що можуть бути виключення з цього правила. Так, антифризні білки впливають не тільки на процеси кристалізації, але й на плавлення кріобіологічних систем [122]. Цікаво, що вони можуть призводити не тільки до збільшення гістерезису між температурою кристалізації і плавлення, але й до появи гістерезису між рівноважною температурою плавлення і експериментально отриманою. Так, Celik Y. зі співавторами отримали перегріті кристали льоду при додаванні антифризних білків з антарктичної бактерії [123].

Плавлення низькомолекулярних речовин протікає зазвичай у вузькому інтервалі температур. Особливість плавлення полімерів полягає в тому, що фазове перетворення кристал-розплав відбувається не при суворо певній температурі, а в деякому температурному інтервалі [124]. Широкий інтервал плавлення має вода, адсорбована на молекулах білка при малій вологості. Її плавлення має вигляд розмазаного по температурі переходу типу "порядок - безлад". Плавлення розчинів протікає у вузькому інтервалі температур тільки в разі евтектичної концентрації. При інших (не евтектичних) концентраціях відбувається розмивання фазового переходу по температурі внаслідок зміни концентрації розчиненої речовини в рідкій фазі при плавленні [125, 126].

Для теоретичного опису процесів плавлення застосовуються наближені моделі, одна з яких модель вільного об'єму, яку запропонували вперше Леннард - Джонс і Девоншир. Ця теорія має лише один параметр порядку, який пов'язано з позиційним дальнім порядком та поступальним ступенем свободи. Згідно даної моделі рідина має структуру аналогічну структурі твердого тіла і приймається, що в рідині молекули можуть переходити з

однієї комірки в іншу, тоді як в твердому тілі рух обмежено одною ділянкою, а усі частини розташовані так, що підтримується ідеальний порядок їх розташування [127]. Ця теорія набула розвитку з додаванням параметрів, які враховують міжмолекулярні взаємодії [128]. У коливальній теорії Ліндемана вважається, що кристал стає механічно нестійким, коли амплітуда теплових коливань атомів досягає певної критичної відстані між атомами [129]. Коливальні теорії застосовуються поки тільки для найпростіших кристалічних структур. Реальні кристали мають складний спектр коливань і не описуються цими теоріями.

Таким чином, процеси кристалізації із переохолодженої рідини після розклування та рекристалізація можуть бути вирішальними пошкоджуючими факторами на етапі нагрівання біологічних зразків, що потребує ретельного відношення до підбору співвідношення швидкостей охолодження і нагрівання. Жодна з існуючих теорій не описує поки досить повно і надійно плавлення реальних речовин, побудованих з молекул зі складними міжмолекулярними взаємодіями, і проведення експериментальних досліджень в даній області є актуальними. Різні види клітин мають різну стійкість до факторів кріоконсервування і потребують індивідуальної розробки протоколу кріоконсервування. При цьому важливими є аналіз низькотемпературних фазових переходів не тільки на етапі охолодження, але і на етапі нагрівання. При підборі кріозахисних речовин важливими є їх склоутворююча здатність, щоб запобігти кристалізації та відсутність токсичності до даного виду клітин. Ефективним є застосування комбінації проникальних і непроникальних кріопротекторів, що дозволяє запобігти внутрішньоклітинної та позаклітинної кристалізації без використання високих токсичних концентрацій кріопротекторів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Матеріали дослідження

У даній роботі досліджували еритроцити бика, коня, кролика та людини. Донорську кров людини (чоловіча, II+), заготовлену на консерванті «ЦФДА-1» («Масо Productions Pologne SP. Z.o.o.», Польща), отримували у Харківському обласному центрі служби крові. Кров тварин отримували на базі Харківської державної зооветеринарної академії, використовували консервант «Глюгіцир» (в об'ємному співвідношенні 1:4). Забір крові бика (2-4 роки) і коня (5-10 років) здійснювали з яремної вени, а кролика (1-2 роки) - з ушної вени шляхом венепункції [130]. Всі тварини були здоровими статевозрілими самцями, імунізованими та вільними від паразитів. Маніпуляції з тваринами здійснювалися професійними ветеринарами згідно Міжнародних принципів "Європейської конвенції про захист хордових тварин, які використовуються з експериментальної та інших наукових цілей" (Страсбург, 1985 р.) та «Загальних принципів експериментів на тваринах», що було схвалено III Національним конгресом по біоетиці (2007 р., Київ).

Цільну кров ссавців центрифугували при 800 g протягом 3 хвилин для видалення плазми, тоді тричі відмивали у 4-кратному об'ємі фізіологічного розчину (рН 7,4) з центрифугуванням при 800 g протягом 3 хвилин. Гематокрит для всіх видів еритроцитів складав не менш 95 %. Кріозахисні середовища, які містили сахарозу, маніт, ДМСО, 1,2-ПД, ПЕО-1500 та гліцерин у різному відсотковому співвідношенні, готували на фізіологічному розчині (рН 7,4). У роботі було проведено дослідження з рядом однокомпонентних кріозахисних середовищ з ДМСО (5%, 10%, 15%, 20%), 1,2-ПД (10%, 20%, 25%, 35%), гліцерином (10%, 15%, 30%) та ПЕО-1500

(10%, 15%, 20%, 30%), а також з різною комбінацією проникальних і непроникальних кріопротекторів:

1. 5% ПЕО-1500+15% ДМСО;
2. 10% ПЕО-1500 +10% ДМСО;
3. 20% ПЕО-1500+10% ДМСО;
4. 10% ПЕО-1500 + 10% ДМСО + 10% 1,2-ПД + 10% сахарози;
5. 15% ПЕО-1500 + 10% ДМСО + 5% 1,2-ПД + 5% сахарози;
6. 15% ПЕО-1500 + 15% ДМСО + 5% 1,2-ПД + 5% сахарози;
7. 20% ПЕО-1500 + 10% ДМСО + 5% 1,2-ПД + 5% сахарози.
8. 10% ПЭГ-1500 + 10% ДМСО + 10% 1,2-ПД +5% сахарози;
9. 20% ПЭГ-1500 + 5% ДМСО +5% 1,2-ПД +5% сахарози
10. 10%ПЭГ-1500 + 10%ДМСО + 10% 1,2-ПД+ 10% маніт.

Кріозахисні розчини до отриманого осаду еритроцитів додавали краплинно в співвідношенні 1:1 і інкубували при кімнатній температурі протягом 15 хв.

Після інкубації еритроцитів з кріозахисними речовинами, зразки у пластикових контейнерах об'ємом 2 мл охолоджували зануренням у рідкий азот (-196°C). Відігрівання здійснювали на водяній бані при $40-42^{\circ}\text{C}$ до появи рідкої фази. Кріопротектори з клітинної суспензії видаляли шляхом поетапного центрифугування. На першому етапі до суспензії еритроцитів додавали у рівному об'ємі 0,6 М NaCl, 10 мМ фосфатного буфера, рН 7,4. Після цього еритроцити двічі промивали розчином 0,15 М NaCl на 10 мМ фосфатному буфері, рН 7,4 [15].

2.2 Методи дослідження

2.2.1 Диференціальна скануюча калориметрія

При нагріванні або охолодженні біологічних зразків у них можуть протікати різні типи фізико-хімічних перетворень [41, 110]. Такі перетворення можуть супроводжуватися як виділенням, так і поглинанням тепла. Для дослідження фазових переходів в даний час розвинені і широко

застосовуються методи диференціального термічного аналізу (ДТА) і більш сучасна його модифікація – ДСК [95, 99, 100]. У ДТА реєструється різниця температур досліджуваного зразка і стандартної речовини як функція часу або температури при нагріванні їх в ідентичних температурних умовах з певною швидкістю. У ДСК реєструється енергія, необхідна для встановлення нульової різниці температур між досліджуваним зразком і стандартом в часі при нагріванні або охолодженні їх в ідентичних температурних умовах з певною швидкістю.

У даній роботі дослідження фазових переходів і склування в області температур від -180°C до 0°C проводились за допомогою ДСК, який було розроблено і виготовлено в ІПК і К НАН України [131]. Даний прилад, відповідно до класифікації Уендландта, можна віднести до приладів типу «ДСК» (ДТА) [132]. Принцип роботи такого калориметра заснований на реєстрації теплових потоків, що надходять до зразка в процесі його безперервного нагрівання. На відміну від звичайного ДТА, тут реєструється інтегральний тепловий потік одночасно в багатьох точках поза зразком. Особливістю даного калориметру є те, що його робочу камеру можна попередньо охолодити до будь-якої заданої температури в діапазоні $-196 \div 0^{\circ}\text{C}$, потім помістити в комірку калориметру зразок, який був заздалегідь охолоджений з будь-якої необхідної швидкістю. Це дозволяє досліджувати зразки, охолоджені з високими швидкостями ($\sim 10^{\circ}$ град/с і більше). В даній роботі зразки охолоджували зануренням у рідкий азот. Середня швидкість охолодження при цьому складала 200 град/хв. Термограми реєстрували на етапі нагріву охолоджених зразків зі швидкістю 0,5 град/хв. Маса досліджуваних зразків складала 1 г.

При наявності в досліджуваному зразку будь-яких процесів, або фазових переходів на кривих ДСК проявляються характерні піки і аномалії, дослідження яких дає інформацію про процеси, що протікають в зразку. Аномалією називається будь-яке відхилення від монотонної зміни сигналу залежно від часу. Такі відхилення можливі при протіканні в зразку процесів,

пов'язаних з виділенням або поглинанням теплоти (хімічні реакції, фазові переходи першого роду) або з різкою зміною теплоємності зразка (склування, фазові переходи другого роду).

Розрізняють екзотермічні (виділення тепла) і ендотермічні (поглинання тепла) аномалії ДСК (рис. 2.2.1), а також стрибок теплоємності.

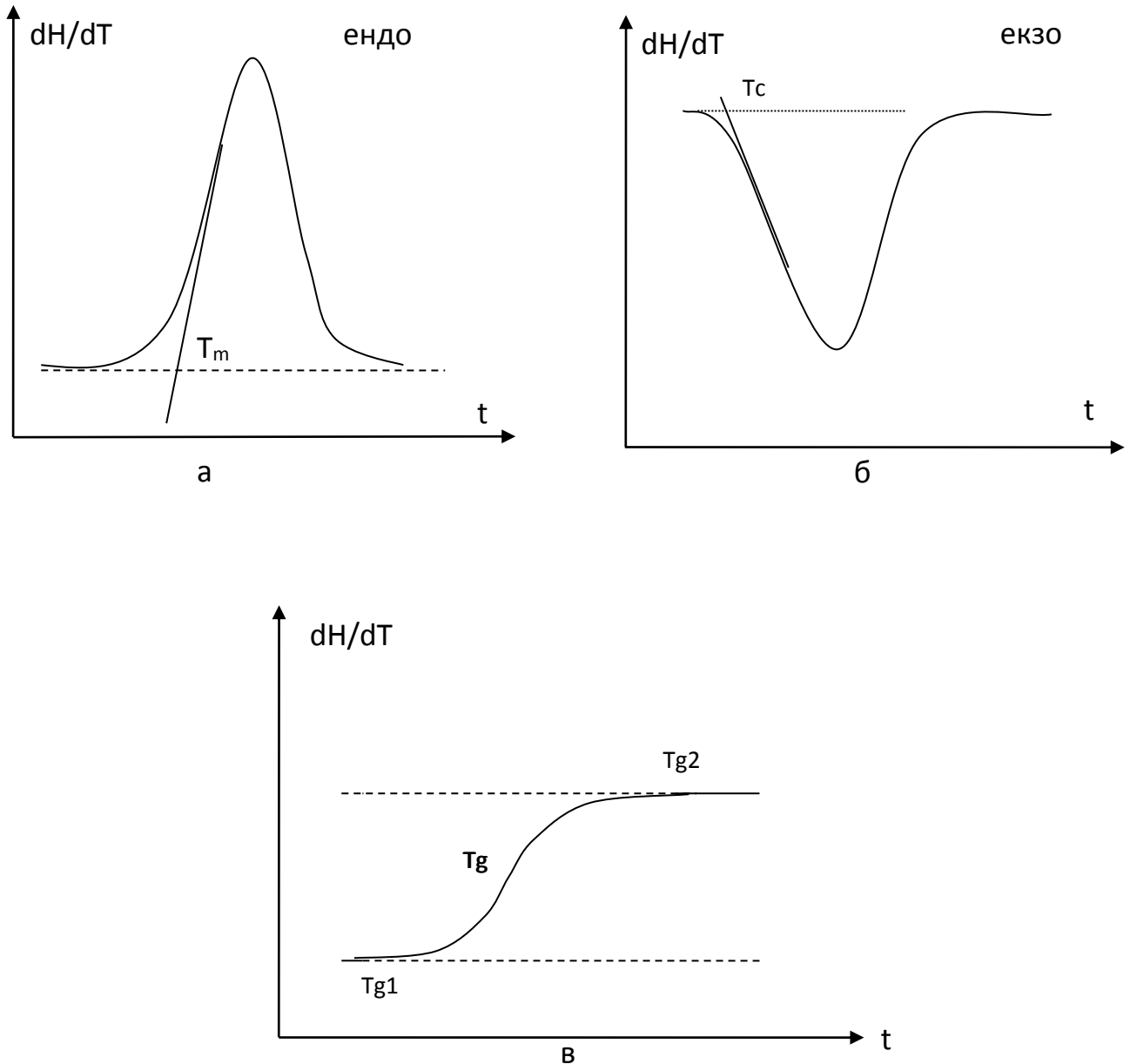


Рис. 2.2.1 Визначення температур фазових переходів і склування. Пояснення у тексті.

Температуру плавлення (T_m) визначали за точкою перетину дотичної до ендотермічного піку плавлення зразка з базовою лінією (рис. 2.2.1 а). Температуру кристалізації (T_c) на етапі нагрівання зразка визначали, як і для плавлення за точкою перетину базової лінії і дотичної до кривої (рис. 2.2.1 б).

Розкльвання (рис. 2.2.1 в) не відбувається в деякій фіксованій точці, а розвивається в певному діапазоні температур і на термограмі має вигляд зміщення базової лінії (стрибок теплопоглинання). Температуру переходу можна визначити або як середнє значення температур початку T_{g1} і закінчення переходу T_{g2} , або як точку перегину кривої.

Похибка вимірювання температур не перевищувала $\pm 0,2$ °С.

2.2.2 Визначення рівня гемоліза спектрофотометричним методом

Ефективність кріопротекторів у різній комбінації оцінювали за гемолізом, осмотичною крихкістю, моделюванням трансфузії еритроцитів після кріоконсервування, методами флуоресцентної і світлової мікроскопії та проточної цитофлуориметрії. Вимірювання гемолізу еритроцитів проводили спектрофотометричним методом при довжині хвилі 543 нм [133]:

$$\% \text{ гемолізу} = [A_1/A_2] * 100\%,$$

де A_1 – оптична щільність дослідженого зразка,

A_2 – оптична щільність при повному гемолізі контрольного зразка еритроцитів. За 100% -й гемоліз брали поглинання проби, в яку додавали детергент тритон Х-100 в концентрації 0,1%.

Збереженість визначали відсотком негемолізованих клітин.

2.2.3 Дослідження осмотичної крихкості еритроцитів

Осмотичну крихкість визначали шляхом перенесення еритроцитів в розчини різної тонічності (0,2 - 0,9% NaCl) при кімнатній температурі [134]. Концентрацію NaCl, при якій спостерігався 50% гемоліз визначали як індекс осмотичної крихкості.

2.2.4 Моделювання трансфузії еритроцитів

Моделювання трансфузії здійснювали перенесенням кріоконсервованих еритроцитів досліджуваних тварин у плазму або фізіологічний розчин і інкубуванням при 37 °С протягом 24-х годин. Розведення еритроцитів при цьому складало 1:10, що відповідає встановленим процедурам трансфузії крові реципієнтам.

2.2.5 Флуоресцентна мікроскопія

На даний час в кріобіології широко використовуються сучасні флуоресцентні методи аналізу клітин, проточна цитофлуориметрія та флуоресцентна мікроскопія [135 – 138]. Флуоресцентні барвники, які використовуються при цьому, повинні реагувати на зміну мікрооточення, мати високі сольватохромні показники і значне зростання квантового виходу при зв'язуванні з біологічними об'єктами [137]. В даній роботі для забарвлення еритроцитів нами було використано барвник 3-DAB (3-диметиламінобензантрон) («SETA BioMedicals», США). Флуоресцентний барвник 3- DAB – нейтральна речовина, яка погано розчиняється у воді і чутлива до полярності оточення (сольватохромний ефект). Володіє достатньою гідрофобністю, щоб проникати в біологічні об'єкти і нековалентно зв'язуватися з біомакромолекулами, що входять до їх складу [137]. Важливо, що 3- DAB має високу фотохімічну стійкість і незначний квантовий вихід флуоресценції у водних середовищах, який у гідрофобній фазі різко зростає. У концентраціях 10^{-4} - 10^{-3} моль не виявляє токсичної дії на клітини [138]. Структурна формула молекули 3-DAB і деякі флуоресцентні характеристики приведено на рис. 2.2.5 та у табл. 2.2.5.

Концентрація барвників в суспензії клітин при мікроскопічних дослідженнях становила 40 мкМ [135], а при цитофлуориметричних вимірах - 4-7 мкМ [137]. Клітини інкубували з барвником 15 хв і відмивали від вільного барвника центрифугуванням при 1300 g протягом 3 хв.

Флуоресцентні зображення еритроцитів отримували на флуоресцентному конфокальному мікроскопі «AxioObserverZ1» («Carl Zeiss», Німеччина) з імерсією при збільшенні $\times 63$. Флуоресцентні зображення клітин отримувалися поміщаючи краплину суспензії еритроцитів проміж предметним та покривним склом и рівномірно розподіляючи тонким шаром. Оцінку морфологічних особливостей еритроцитів здійснювали згідно класифікації [139].

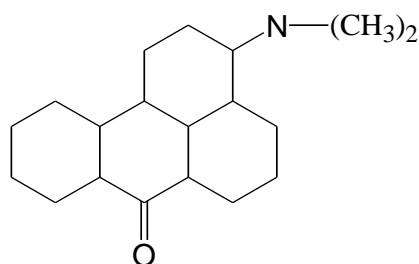


Рис 2.2.5 Структурна формула 3- DAB.

Таблиця 2.2.5

Флуоресцентні характеристики барвника 3- DAB [138]

Молекулярна маса (M)	273,33 г/моль
Молярний коефіцієнт екстинкції (ϵ)	$10250 \text{ моль}^{-1} \times \text{см}^{-1}$
Максимум спектра поглинання (λ_{abs})	470 нм
Максимум спектра флуоресценції (λ_{fl})	666 нм
Квантовий вихід флуоресценції в етанолі (QY)	0,11

2.2.6 Цитофлуориметрія

Флуоресцентні характеристики еритроцитів, забарвлених зондами, досліджували за допомогою проточного цитофлуориметра «FACS Calibur» («Becton Dickinson», США). Флуоресценцію збуджували світлом з довжиною хвилі 488 нм (аргоновий лазер).

2.2.7 Методи статистичного аналізу

Кожний експеримент повторювали не менше 6 разів. Дані наведено як середнє значення \pm стандартне відхилення. Для перевірки статистичної значимості відмінностей числових показників, що досліджувались, використовували U-критерій Манна-Уїтні. Статистично достовірними вважали результати при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНІ ФАЗОВІ ПЕРЕХОДИ І СКЛУВАННЯ У СУСПЕНЗІЯХ ЕРИТРОЦИТІВ ССАВЦІВ В ПРИСУТНОСТІ КРІОЗАХИСНИХ СПОЛУК

3.1 Фазові переходи і склування у кріозахисних середовищах для кріоконсервування еритроцитів при температурах нижче 0°C

3.1.1 Низькотемпературні фазові переходи і склування в однокомпонентних кріозахисних середовищах

Низькотемпературне консервування клітинних суспензій включає етапи охолодження, зокрема до температури рідкого азоту, та відігрівання біологічних об'єктів. При цьому в них може протікати ряд складних фізичних процесів, таких, як кристалізація льоду, плавлення, формування метастабільних станів та інші [48, 41, 42], які здатні викликати пошкодження клітинних структур. Треба відмітити, що зміни біохімічних показників клітин можуть тривати і після кристалізації основної маси розчинника аж до склування рідкої фази, що залишилася. Тому тривале зберігання біологічних зразків необхідно проводити при температурі нижче температури склування зразка. Ця температура може варіюватися в залежності від використовуваних при кріоконсервуванні компонентів кріозахисного середовища, що підбираються для кожного типу клітин індивідуально.

Згідно даних літератури, найбільш широке використання при кріоконсервуванні еритроцитів ссавців набули кріозахисні середовища на основі гліцерину, 1,2-ПД, ДМСО і ПЕО-1500 [15, 140 – 145]. У зв'язку з цим метою першого етапу дослідження було проаналізувати низькотемпературні фазові переходи і склування в перспективних кріозахисних розчинах на основі одного кріопротектору.

Калориметричні термограми було отримано на етапі нагріву зі швидкістю 0,5 град/хв, попередньо охолоджених до -196°C розчинів кріопротекторів. Як видно, на усіх отриманих термограмах реєструється стрибок теплопоглинання 1 та декілька екзо- та ендотермічних ефектів (рис. 3.1.1.1), які інтерпретовано згідно [146 – 147] наступним чином:

1. Стрибок теплопоглинання 1 відповідає процесу переходу з твердоаморфного стану в стан переохолодженої рідини (T_g). Тобто це процес розкльовання засклованої на етапі охолодження частини зразка.

2. Розмитий екзотермічний пік 2 відповідає завершенню кристалізації льоду при нагріванні (T_c). Високі швидкості охолодження, які використано у роботі, призводять до того, що частина розчинника не встигає закристалізуватися на етапі охолодження і цей процес продовжується на етапі повільного нагріву.

3. Екзотермічний пік 3 відповідає кристалізації евтектичних складів (T_{ce}) вода-ДМСО (рис. 3.1.1.1, в) та, відповідно, вода-ПЕО-1500 (рис. 3.1.1.1, г). Кристалізація евтектики, як і кристалізація льоду, не встигає повністю завершитися на етапі охолодження і продовжується при досягненні відповідної температури при нагріванні з низькими швидкостями.

4. Ендотермічний пік 4 відповідає плавленню евтектичних складів (T_{me}) вода-ДМСО і вода-ПЕО-1500. Механічна суміш кристалів евтектичного складу, яка була закристалізована на етапі охолодження і на етапі нагріву, плавиться при досягненні відповідної температури плавлення евтектики (T_{me}).

5. Пік теплопоглинання 5 – плавлення льоду в системі (T_m). Це процес зворотній до кристалізації на етапі охолодження. Оскільки при охолодженні водний розчин не кристалізується цілком при постійній температурі на відміну від чистої рідини, тому і на етапі нагріву ми спостерігаємо плавлення в деякому інтервалі температур. Це пов'язано з тим, що по мірі плавлення льоду концентрація розчинених речовин знижується і температура плавлення наступної порції розчинника підвищується.

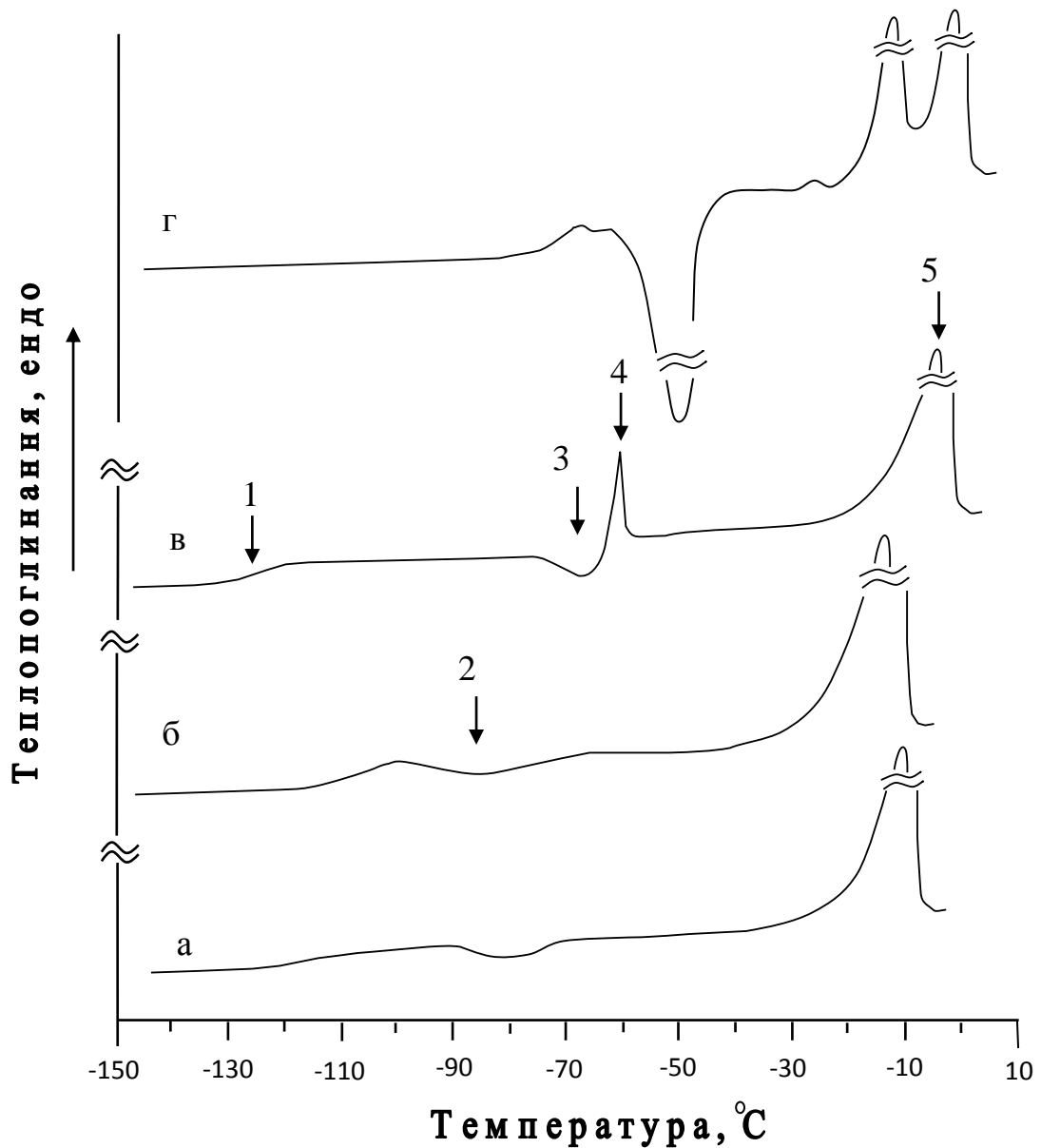


Рис. 3.1.1.1 ДСК-термограми однокомпонентних розчинів кріопротекторів: 30% гліцерину (а), 35% 1,2-ПД (б), 20% ДМСО (в), 30% ПЕО-1500 (г).

Можна відмітити, що ПЕО-1500 більш схильний до утворення евтектичних складів і піки кристалізації і плавлення евтектичних складів реєструються при всіх досліджених концентраціях ПЕО-1500: 10%, 15%, 20%, 30% (табл. 3.1.1.1). Для 5% і 10% розчинів ДМСО процеси евтектичної кристалізації не спостерігаються (табл. 3.1.1.1), а для 15% і 20% розчинів

ДМСО піки кристалізації і плавлення евтектичних складів мають значно меншу інтенсивність, ніж для розчинів ПЕО-1500 відповідної концентрації.

Таблиця 3.1.1.1

Розвиток процесів кристалізації і плавлення евтектичних складів у однокомпонентних середовищах

Кріопротектор	Концентрація, %	Кристалізація евтектики	Плавлення евтектики
ПЕО-1500	10	+	+
	15	+	+
	20	+	+
	30	+	+
ДМСО	5	-	-
	10	-	-
	15	+	+
	20	+	+
1,2-ПД	10	-	-
	20	-	-
	25	-	-
	35	-	-
Гліцерин	10	-	-
	15	-	-
	30	-	-

Було проведено порівняльний аналіз температур склування розчинів гліцерина, 1,2-ПД, ДМСО і ПЕО-1500 для концентрацій, які знайшли застосування у кріобіології (рис. 3.1.1.2).

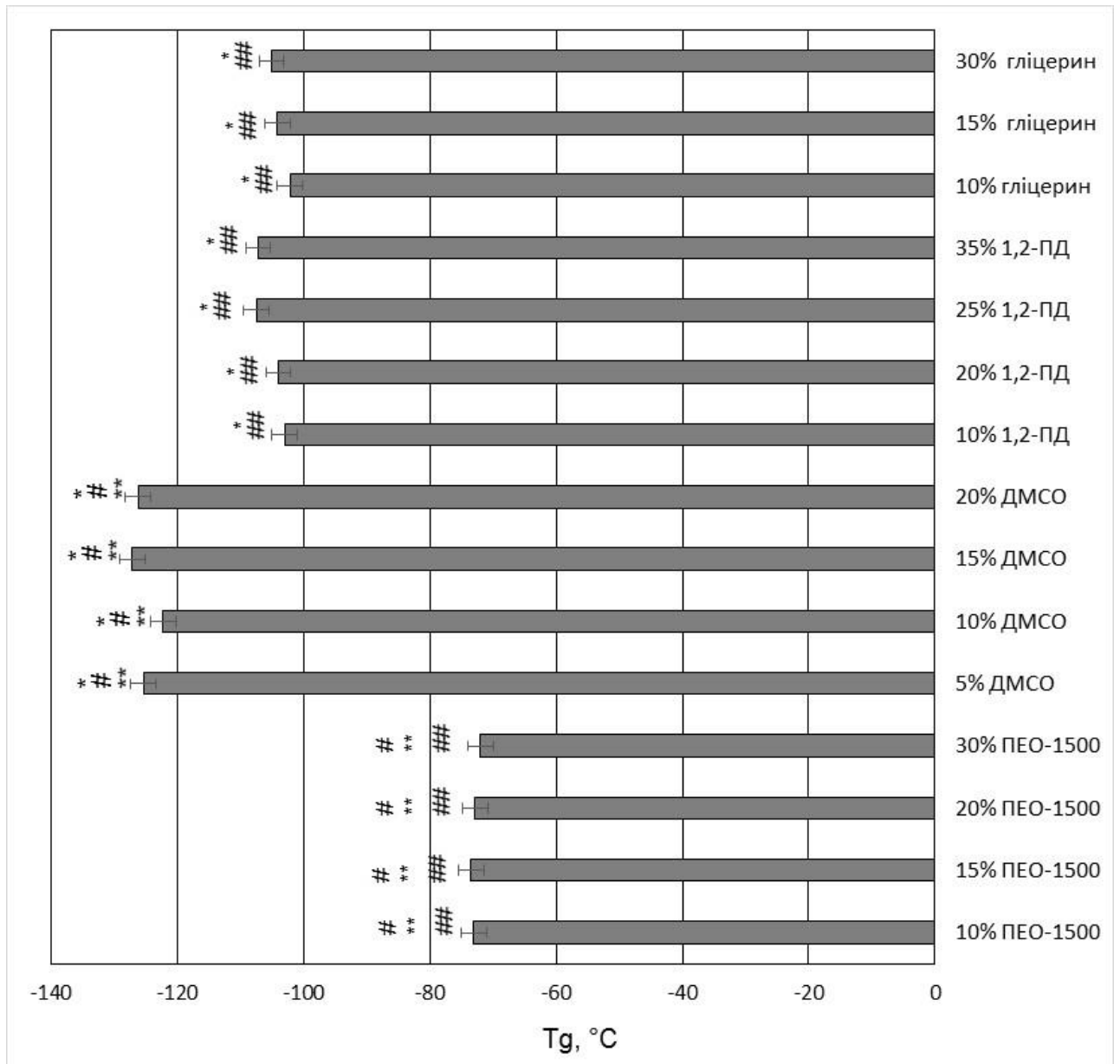


Рис. 3.1.1.2 Температура склування (T_g) у однокомпонентних середовищах.

* – статистично значимі відмінності у порівнянні з розчинами ПЕО-1500 ($p < 0,05$), $n=6$; # – статистично значимі відмінності у порівнянні з розчинами 1,2-ПД ($p < 0,05$), $n=6$; ** – статистично значимі відмінності у порівнянні з розчинами гліцерину ($p < 0,05$), $n=6$; ## – статистично значимі відмінності у порівнянні з розчинами ДМСО ($p < 0,05$), $n=6$.

Порівнюючи температури склування розчинів досліджених кріозахисних речовин, можна відмітити, що процес повного затвердіння рідини у розчинах ДМСО відбувається при температурах достовірно нижчих, ніж у всіх інших досліджених кріопротекторів, а для розчинів ПЕО-1500 – при температурах достовірно вищих за інші кріопротектори (рис. 3.1.1.2). Між розчинами 1,2-ПД і гліцерина достовірних відмінностей у температурі склування зареєстровано не було.

У роботі також було проведено оцінку кількості склоподібної фази, яка формується при охолодженні однокомпонентних кріозахисних розчинів (рис. 3.1.1.3).

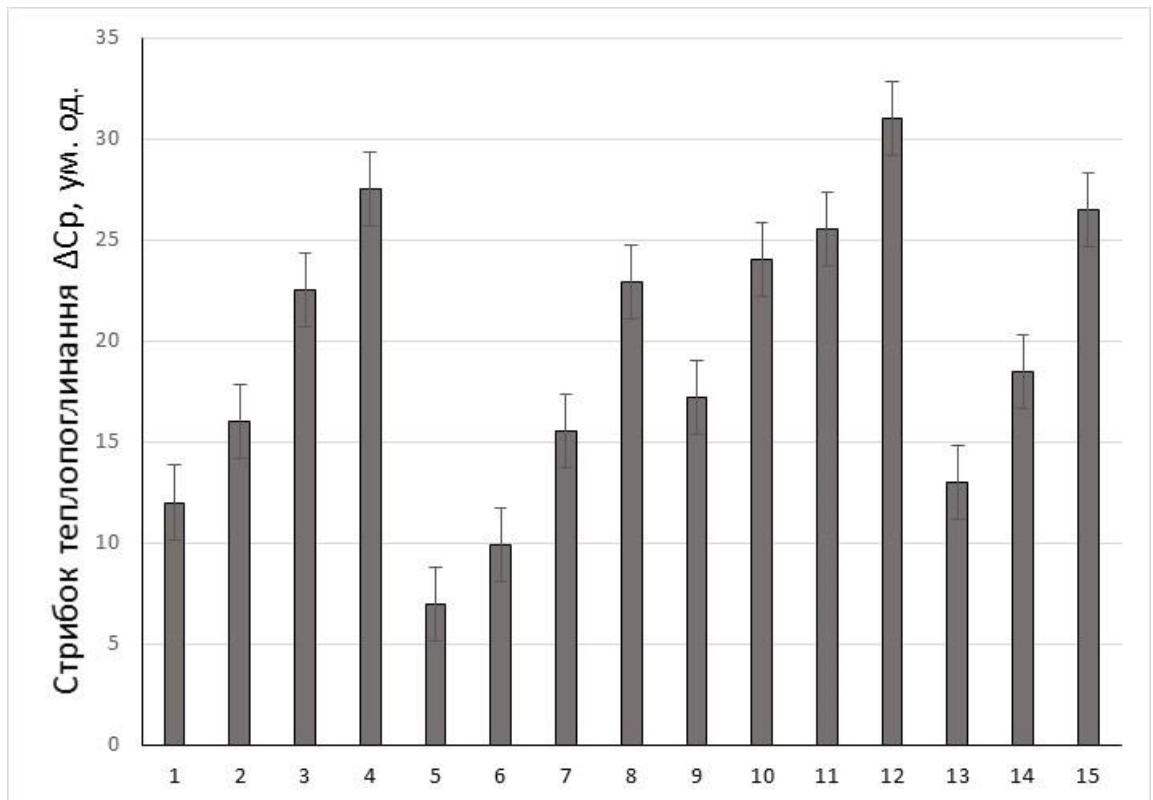


Рис. 3.1.1.3 Свідок теплопоглинання при склуванні у однокомпонентних середовищах кріоконсервування: 1 – 10% ПЕО-1500; 2 – 15% ПЕО-1500; 3 – 20% ПЕО-1500; 4 – 30% ПЕО-1500; 5 – 5% ДМСО; 6 – 10% ДМСО; 7 – 15% ДМСО; 8 – 20% ДМСО; 9 – 10% 1,2-ПД; 10 – 20% 1,2-ПД; 11 – 25% 1,2-ПД; 12 – 35% 1,2-ПД; 13 – 10% гліцерин; 14 – 15% гліцерин; 15 – 30% гліцерин.

Порівняльний аналіз склоутворюючої здатності кріопротекторів було проведено на основі інтенсивностей стрибка теплопоглинання на ДСК-термограмах. Видно, що при підвищенні концентрації всіх досліджених кріопротекторів інтенсивність стрибка теплопоглинання Δ зростає, але у різному ступеню в залежності від виду кріопротектору (рис. 3.1.1.3).

Таким чином, кріозахисні розчини на основі ДМСО і ПЕО-1500 мають схильність до кристалізації евтектичних складів, на відміну від гліцерину і 1,2-ПД, для яких розвиток цього процесу не є характерним. Температура склування розчинів ДМСО достовірно нижча за температуру склування розчинів ПЕО-1500, 1,2-ПД і гліцерина. У кріозахисних розчинах ПЕО-1500 температура склування достовірно вища за інші досліджені кріопротектори. Температура склування повинна бути обов'язково врахована при розробці протоколів кріоконсервування біооб'єктів, як температура повного тверднення, нижче за якої і потрібно зберігати біологічні зразки.

3.1.2 Низькотемпературні фазові переходи і склування у комбінованих кріозахисних середовищах

Хоча велика кількість досліджень у даний час присвячена кріоконсервуванню біологічних об'єктів із застосуванням складних кріозахисних середовищ [17, 18, 148, 149], фізичні процеси, що протікають при температурах нижче 0 °С у комбінованих розчинах кріопротекторів, мало вивчені. Однак інтерес дослідників до цього питання у останні роки значно зріс [13, 96, 150]. Виявлено, що всі кріозахисні добавки, також як і вміст води у розчині, впливають на температуру склування, кристалізації і плавлення.

У роботі було досліджено фазові переходи і склування у багатокомпонентних розчинах кріопротекторів з кріозахисними речовинами різного типу дії (екзо- та ендоцелюлярних) для виявлення закономірностей їх впливу на розвиток тих чи інших фазових станів та температури остаточного

тверднення усього зразка (склування). Було проаналізовано закономірності розвитку фазових переходів, їх температури і інтенсивності у складних кріозахисних розчинах, які містять ПЕО-1500, ДМСО, 1,2-ПД і сахарозу у різних концентраціях. На рис. 3.1.2.1, у якості прикладу, наведено дві термограми кріозахисних середовищ, які містять ПЕО-1500 і ДМСО. Видно, що при концентрації цих сполук до 10% кристалізація евтектичних складів не розвивається, хоча у окремому 10% розчині ПЕО-1500 вона реєструється (табл. 3.1.1.1). Евтектична кристалізація ДМСО і ПЕО-1500 розвивається у різних температурних діапазонах (рис. 3.1.1.1). Зміни межмолекулярних взаємодій у їх суміші з водою призводять до затруднення розвитку кристалізації евтектичних складів при таких концентраціях ДМСО і ПЕО-1500. Підвищення концентрації ПЕО-1500 у суміші призводить до розвитку кристалізації і плавлення евтектичних складів у температурному діапазоні, який є характерним саме для ПЕО-1500 (рис. 3.1.2.1, б).

На основі отриманих ДСК термограм комбінованих середовищ було визначено температури фазових переходів і склування, які приведені у таблиці 3.1.2.1. Можна бачити, що при переважанні ПЕО-1500 у розчинах ПЕО-1500 з ДМСО кристалізація і плавлення евтектичних складів розвиваються, а при протилежному співвідношенню - ні. Можна казати про те, що високомолекулярний кріопротектор ПЕО-1500 відіграє вирішальну роль у розвитку цього процесу у комбінованих розчинах, перешкоджаючи розвитку кристалізації евтектики вода - ДМСО. Так у 15% розчину ДМСО ми спостерігали кристалізацію і плавлення евтектичних складів (табл. 3.1.1.1), а у розчині, який містить 15% ДМСО і 5% ПЕО-1500 розвитку цих процесів ми не реєструємо (табл. 3.1.2.1).

При дослідженні ПЕО різних молекулярних мас автором роботи [131] було виявлено, що водні системи з ПЕО великих молекулярних мас (більше 600) можуть бути виділені в окрему групу, яка відрізняється більш легкою кристалізацією евтектики, ніж малих молекулярних мас (від діетиленгліколю до ПЕО-600). Кристалізація евтектики може бути

пояснена переходом молекул ПЕО від лінійної до більш компактною спіральної або клубкообразной конфігурації, при якій усереднюється анізотропія міжмолекулярних взаємодій.

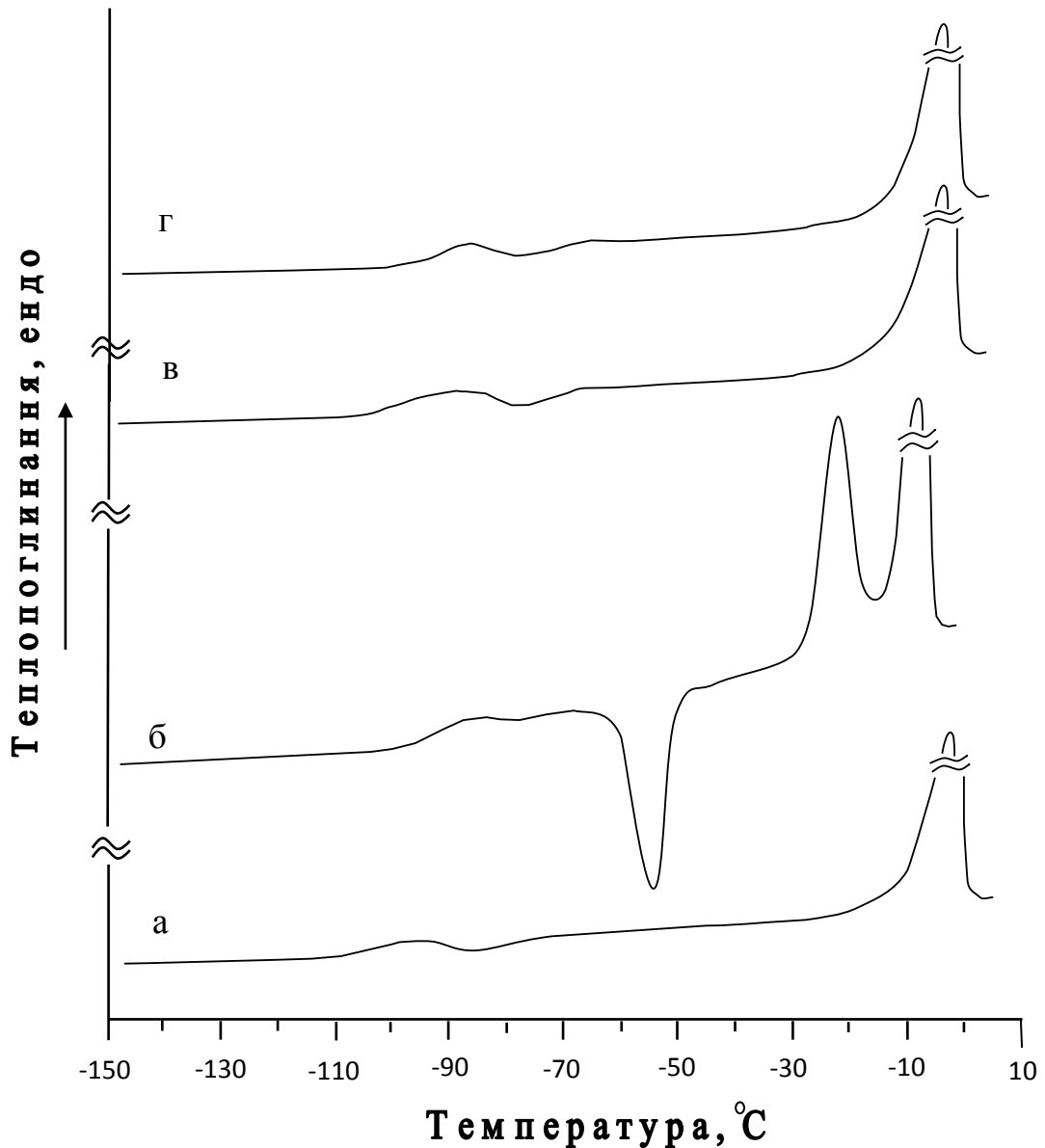


Рис. 3.1.2.1 ДСК-термограми комбінованих розчинів кріопротекторів: а – 10% ПЕО-1500+10% ДМСО; б – 20% ПЕО-1500 + 10% ДМСО; в – 7,5% ПЕО-1500 + 7,5% ДМСО + 2,5% 1,2-ПД + 2,5% сахароза; г – 10% ПЕО-1500 + 5% ДМСО + 2,5% 1,2-ПД + 2,5% сахароза.

У багатокomпонентних середовищах з ПЕО-1500, ДМСО, 1,2-ПД і сахарозою в жодній дослідженій комбінації кристалізації чи плавлення евтектичних складів вода - ДМСО або вода-ПЕО-1500 зареєстровано не було. Цей факт може бути пов'язаний з присутністю в середовищі сахарози.

Таблиця 3.1.2.1

Температури фазових переходів і склування в комбінованих кріозахисних середовищах

Середовище	T_g , °C	T_c , °C	T_{ce} , °C	T_{me} , °C	T_m , °C
2,5% ПЕО-1500+7,5% ДМСО	-101,1	-64,5	—	—	-0,5
5% ПЕО-1500 +5% ДМСО	-97,5	-84,2	—	—	-3,9
5% ПЕО-1500+15% ДМСО	-115,5	-92	—	—	-14,5
10% ПЕО-1500+5% ДМСО	-92,2	—	-51,5	-28,7	-6,1
10% ПЕО-1500+10% ДМСО	-104,5	-87,2	—	—	-10,2
20% ПЕО-1500+10% ДМСО	-91,5	—	-60	-26	-16
5% ПЕО-1500 + 5% ДМСО + 5% 1,2 ПД + 5% сахароза	-94,8	-74,9	—	—	-12,5
7,5% ПЕО-1500 + 5% ДМСО + 2,5% 1,2 ПД + 2,5% сахароза	-95,2	-77,2	—	—	-7,3
7,5% ПЕО-1500 + 7,5% ДМСО + 2,5% 1,2 - ПД + 2,5% сахароза	-99	-79,2	—	—	-10
10% ПЕО-1500 + 5% ДМСО + 2,5% 1,2 ПД + 2,5% сахароза	-92,8	-77,5	—	—	-9,8

Примітки: T_g – температура склування, T_c – температура кристалізації при нагріві, T_{ce} – температура кристалізації евтектичних складів, T_{me} – температура плавлення евтектичних складів, T_m – температура плавлення.

Автор роботи [151] спостерігав зникнення ендо- та екзотермічних ефектів, пов'язаних з кристалізацією і плавленням евтектики, в системі вода-етиленгліколь при додаванні 3% сахарози. Один з можливих механізмів, що призводять до таких змін, на думку автора, - зв'язування молекул етиленгліколю з сахарозою і руйнування гідратів вода - етиленгліколь. Аналогічне явище, мабуть, спостерігається і в випадку ПЕО-1500 та ДМСО.

Можна відмітити, що у всіх досліджених кріозахисних середовищах після швидкого охолодження реєструється кристалізація на етапі нагріву (табл. 3.1.2.1). Тобто при охолодженні утворюється нерівноважна аморфна фаза і швидкість нагрівання має вирішальне значення для того, щоб після розклування у переохолодженій рідині не розпочалася кристалізація [41, 152]. Це надважливо для кріобіології, оскільки кристалізація при нагріві і рекристалізація можуть діяти більш згубно, ніж кристалізація на етапі охолодження [95]. Для калориметричних досліджень звичайно використовують низькі швидкості нагріву для якісної реєстрації фазових переходів. У даній роботі швидкість нагріву складала 0,5 град/хв, а у реальних протоколах кріоконсервування біологічні зразки звичайно відігрівають набагато швидше. При цьому чим вища швидкість відігрівання, тим більша імовірність запобігти розвитку кристалізації на етапі нагріву та рекристалізації (яка не реєструється методом ДСК). Процеси рекристалізації залежать як від типу кріопротектору і його концентрації, так і від режимів охолодження та нагріву.

З отриманих даних видно також, що у всіх досліджених зразках спостерігаються відмінності в температурі склування (табл. 3.1.2.1), пов'язані з різним співвідношенням кріопротекторів в комбінованих середовищах. Можна відзначити деяку закономірність у її зміні: вона знижується при збільшенні концентрації ДМСО і підвищується при збільшенні концентрації ПЕО-1500, що може бути пов'язано з більш низькою температурою склування водних розчинів ДМСО (рис. 3.1.1.2). Тобто додавання в середовище кріоконсервування високомолекулярного кріопротектора

ПЕО-1500 дозволяє підвищити температуру повного затвердіння всієї рідкої фази. Підвищення температури склування дає можливість більш широкого вибору температури зберігання і відповідного низькотемпературного обладнання, при цьому допустимі коливання температури зберігання біологічного зразка нижче температури склування. Це робить комбіновані середовища з більш високою температурою склування перспективнішими для застосування в клінічній практиці.

У роботі було проаналізовано інтенсивності стрибка теплопоглинання l у комбінованих середовищах, який характеризує кількість склоподібної фази, утвореної при охолодженні кріозахисного розчину (рис. 3.1.2.2). Інтенсивність склування (стрибок теплопоглинання l) різна для всіх зразків, вона залежить від сумарної концентрації кріопротекторів у середовищі, від їх співвідношення та виду кріопротекторів. Можна відмітити, що визначний вплив на кількість склоподібної фази, що утворилася при охолодженні кріозахисних розчинів, має сумарна концентрація кріопротекторів у середовищі. Підвищення концентрації ПЕО-1500, ДМСО або 1,2-ПД призводять до збільшення кількості склоподібної фази, що формується при охолодженні кріозахисних розчинів. Це пояснюється високою склоутворюючою здатністю цих кріопротекторів. Так, автор роботи [131] говорить про утворення розгалуженої сітки водневих зв'язків у системах вода - ПЕО, тоді як у водних розчинах цукрів такої властивості не виявлено. Тому водні розчини ПЕО, на відміну від водних розчинів сахарів, більш схильні до утворення склоподібних форм та інших метастабільних станів.

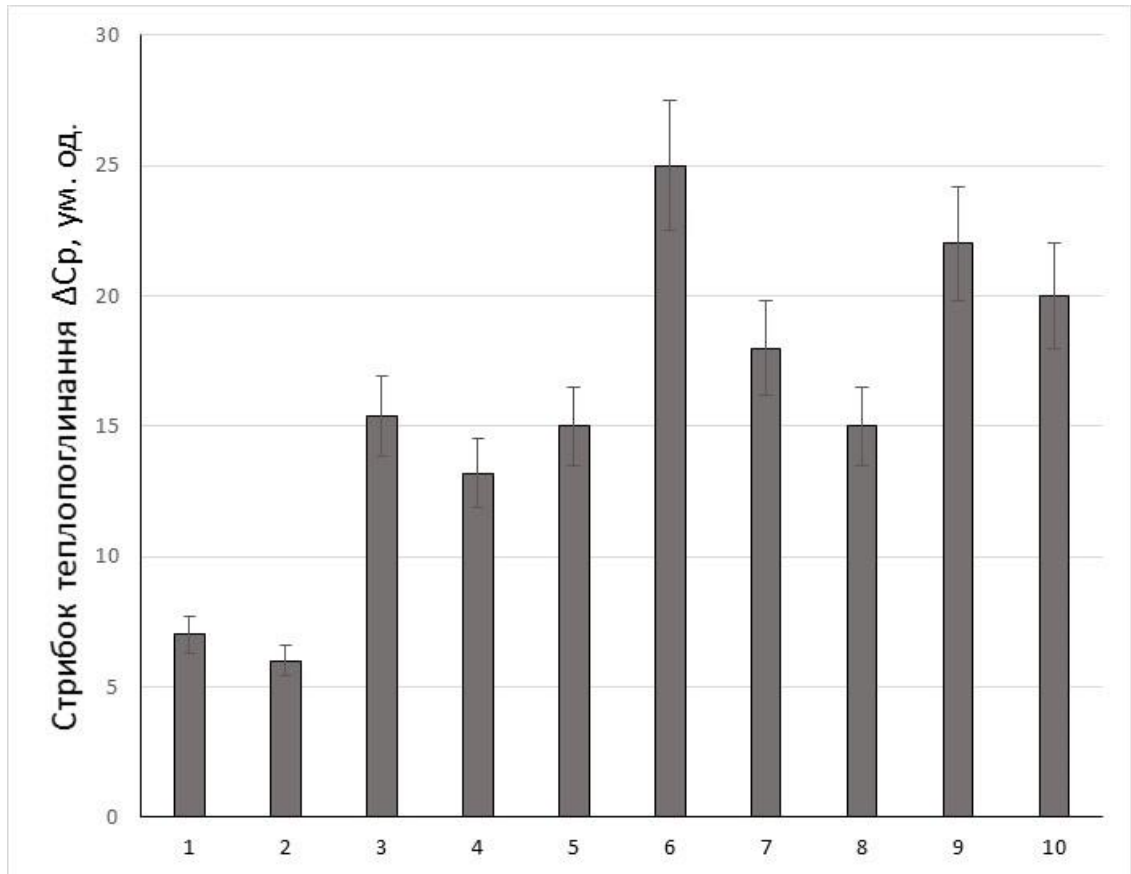


Рис. 3.1.2.2 Стрибок теплопоглинання при склуванні у комбінованих середовищах кріоконсервування: 1 – 2,5% ПЕО-1500+7,5% ДМСО; 2 – 5% ПЕО-1500 +5% ДМСО; 3 – 5% ПЕО-1500+15% ДМСО; 4 – 10% ПЕО-1500+5% ДМСО; 5 – 10% ПЕО-1500+10% ДМСО; 6 – 20% ПЕО-1500+10% ДМСО; 7 – 5% ПЕО-1500 + 5% ДМСО + 5% 1,2-ПД + 5% сахароза; 8 – 7,5% ПЕО-1500 + 5% ДМСО + 2,5%-1,2 ПД + 2,5% сахароза; 9 – 7,5% ПЕО-1500 + 7,5% ДМСО + 2,5% 1,2-ПД + 2,5% сахароза; 10 – 10% ПЕО-1500 + 5% ДМСО + 2,5% 1,2-ПД + 2,5% сахароза.

Таким чином, багатоконпонентні кріозахисні середовища володіють високою склоутворюючою здатністю, яка залежить від сумарної концентрації і типу кріопротекторів. Змінюючи співвідношення різних кріозахисних речовин у розчині можна регулювати температуру склування, адаптуючи середовище для конкретних умов зберігання біологічних об'єктів. Високі швидкості охолодження, які дозволяють отримати максимальну кількість

засклованої рідини на етапі охолодження кріозахисних розчинів, призводять до формування метастабільного склоподібного стану (при концентраціях кріопротекторів, які використовуються у кріобіології, тобто не є занадто токсичними для живих клітин). На етапі нагріву після розклування засклованого при охолодженні кріозахисного розчину може розвиватись кристалізація. Для збереженості клітин при кріоконсервуванні у таких розчинах вирішальну роль грає швидкість нагрівання.

3.2 Фазові переходи і склування у суспензіях еритроцитів ссавців при температурах нижче 0°C

Розвиток фазових переходів в біологічних об'єктах у присутності кріозахисних речовин може відрізнитися від фазових переходів у водних розчинах з відповідною концентрацією кріопротекторів [146, 147, 153, 154]. Тому у даній частині роботи було досліджено фазові переходи в суспензіях еритроцитів ссавців з комбінованими і однокомпонентними кріозахисними середовищами. На першому етапі було проаналізовано чи є відмінності між фазовими переходами у суспензіях еритроцитів коня, бика, кролика та людини. Статистично значимої різниці виявлено не було. Основний вплив на температури і інтенсивності фазових переходів вносить кріозахисна речовина, а внесок еритроцитів у розвиток цих процесів не залежав від виду ссавців. Далі наведено дані, щодо фазових переходів і склування у суспензіях еритроцитів коня.

Характерні термограми ДСК зразків крові коня, отримані на етапі нагріву після охолодження суспензії клітин до температури рідкого азоту, представлені на рис. 3.2.1. На підставі отриманих ДСК - термограм визначені температури фазових переходів і склування в усіх досліджених зразках (табл. 3.2.1, 3.2.2). Як видно з наведених даних, у всіх зразках еритроцитів, окрім еритромаси без кріозахисних речовин, зареєстровано стрибок теплопоглинання 1, який відповідає процесу переходу з твердоаморфного

стану у стан переохолодженої рідини, але температура розклування (T_g) відрізняється в залежності від використаних кріопротекторів.

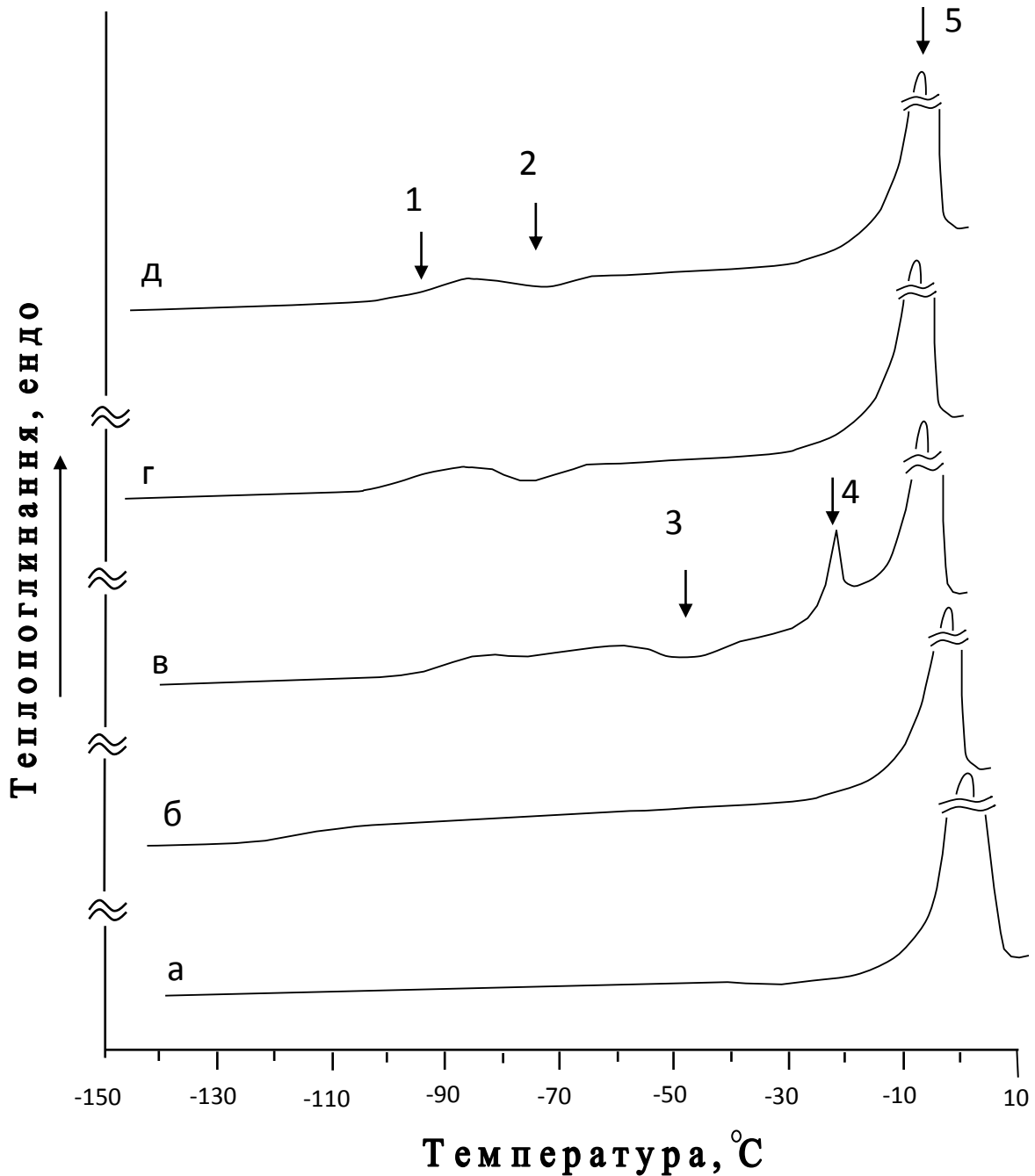


Рис. 3.2.1 ДСК - термограми еритроцитів коня у контролі (а), та після змішування з комбінованими кріозахисними середовищами у співвідношенні (1:1): 5% ПЕО-1500 + 15% ДМСО (б), 20% ПЕО-1500 + 10% ДМСО (в), 10% ПЕО-1500 + 10% ДМСО + 10% 1.2-ПД + 10% сахароза (г), 15% ПЕО-1500 + 10% ДМСО + 5% 1.2-ПД + 5% сахароза (д).

Як і для кріозахисних розчинів (без клітин, див. табл. 3.1.2.1), найнижча температура склування зареєстрована при застосуванні ДМСО, а найвища при використанні високомолекулярного кріопротектора ПЕО-1500. Тривале зберігання клітинних суспензій необхідно проводити при температурних нижче температури склування, оскільки наявність молекулярної рухливості в зразках до моменту повного затвердіння дозволяє протікати біохімічним реакціям і час можливого зберігання еритроцитів без втрати їх біологічної активності буде значно нижчим.

Таблиця 3.2.1

Температури фазових переходів и склування в суспензіях еритроцитів коня з однокомпонентними кріозахисними середовищами (1:1)

Зразок	T_g , °C	T_c , °C	T_{ce} , °C	T_{me} , °C	T_m , °C
Контроль	—	—	—	—	-0,5
20% ПЕО-1500	-71,9	—	-54,3	-17,5	-2
30% ПЕО-1500	-72	—	-57	-18	-9
20% ДМСО	-118,3	—	—	—	-6,2
25% ДМСО	-125,2	—	-83,6	-61,5	-9,4
25% 1,2 ПД	-104	-74	—	—	-11
35% 1,2 ПД	-105	-76,8	—	—	-14,5
30% гліцерина	-101	-75,5	—	—	-10

Примітки: T_g – температура склування, T_c – температура кристалізації при нагріві, T_{ce} – температура кристалізації евтектичних складів, T_{me} – температура плавлення евтектичних складів, T_m – температура плавлення.

При підвищенні концентрації ДМСО, а також у всіх зразках еритроцитів з однокомпонентними розчинами з ПЕО-1500 реєструються екзо- та ендотермічні піки 3 і 4 (рис. 3.2.1), які свідчать про кристалізацію (T_{ce}) та плавлення евтектичних складів (T_{me}) в суспензіях еритроцитів. Кристалізація і плавлення евтектичних складів вода - ДМСО та вода - ПЕО-1500 з'являються у суспензіях еритроцитів при більш високих концентраціях цих кріопротекторів, ніж у відповідних розчинах без клітин та мають меншу інтенсивність.

Таблиця 3.2.2

Температури фазових переходів и склування в суспензіях еритроцитів коня комбінованими кріозахисними середовищами (1:1)

Зразок	T_g , °C	T_c , °C	T_{ce} , °C	T_{me} , °C	T_m , °C
5% ПЕО-1500+15% ДМСО	-114,5	-58,3	—	—	-5
10% ПЕО-1500+10% ДМСО)	-104	-61,5	—	—	-4,5
20% ПЕО-1500 +10%ДМСО	-88	-77,9	-49,5	-26	-8,5
10% ПЕО-1500 +10%ДМСО+10% 1,2-ПД+10% сахароза	-95,1	-74,9	—	—	-12
15% ПЕО-1500 + 10% ДМСО + 5% 1,2 ПД + 5% сахароза	-92	-75	—	—	-9
15% ПЕО-1500 + 15% ДМСО + 5% 1,2 ПД + 5% сахароза	-97	-75,9	—	—	-13
20% ПЕО-1500 + 10% ДМСО + 5% 1,2 ПД + 5% сахароза	-91,5	-75,3	—	—	-13,2

Примітки: T_g – температура склування, T_c – температура кристалізації при нагріві, T_{ce} – температура кристалізації евтектичних складів, T_{me} – температура плавлення евтектичних складів, T_m – температура плавлення.

Подібні закономірності виявлено автором роботи [151] при дослідженні фазових переходів у суспензіях еритроцитів людини з розчинами етиленгліколю. При значних добавках етиленгліколю до суспензії еритроцитів (при кінцевих концентраціях понад 25%) характерні ендотермічні ефекти проявлялись при температурах, близьких до тих же, що і в бінарній системі вода - ЕГ, хоча мали значно меншу інтенсивність. Автор пояснює цей ефект тим, що "адсорбційна ємність" еритроцитів по відношенню до етиленгліколю обмежена і при концентрації його вище деякого значення, в системі з'являються молекули етиленгліколю, не пов'язані з еритроцитами.

У всіх досліджених зразках суспензій еритроцитів зареєстровано пік теплопоглинання 5, який відповідає плавленню льоду у зразках (T_m). Це свідчить про кристалізацію основної маси розчинника при охолодженні суспензії еритроцитів (табл. 3.2.1, 3.2.2).

Високі швидкості охолодження, які було використано у роботі, призводять до того, що кристалізація розчинника не встигає завершитися на етапі охолодження і при нагріві спостерігається завершення кристалізації льоду (розмитий екзотермічний пік 2, T_c). Завершення процесу кристалізації льоду у щільному осаді еритроцитів з кріоконсервуючими середовищами протікає при більш високих температурах, в порівнянні з температурами переходу в самих кріозахисних середовищах відповідних концентрацій (табл. 3.2.1, 3.2.2, рис. 3.1.1.1, табл. 3.1.2.1). Цей факт, ймовірно, пов'язаний з кінетичними ускладненнями при зростанні кристалів льоду, зумовленими великою кількістю білків у внутрішньоклітинній рідині, що сприяє утворенню колоїдної системи з колективними міжмолекулярними взаємодіями [155]. Беручи до уваги, що внутрішньоклітинна рідина є в основній масі набором білків, розчинених у воді, можна вважати, що розчинені білки сприяють утворенню колоїдної системи з колективними міжмолекулярними взаємодіями. В результаті виникають кінетичні ускладнення при зростанні кристалів льоду [156].

Температура плавлення суспензії еритроцитів у присутності кріозахисних речовин трохи нижче температури плавлення кріоконсервуючих середовищ, які містять відповідні концентрації кріозахисних речовин (табл. 3.2.1, 3.2.2, рис. 3.1.1.1, табл. 3.1.2.1).

У роботі було проведено порівняльний аналіз стрибка теплопоглинання, який є пропорційним кількості склоподібної фази, що утворено при охолодженні суспензій еритроцитів у присутності однокомпонентних і комбінованих кріозахисних середовищ (рис. 3.2.2, 3.2.3). Інтенсивність стрибка теплопоглинання трохи вища в суспензіях еритроцитів у присутності кріозахисних середовищ у порівнянні зі склуванням в середовищах без клітин. Можливо, компоненти клітин пов'язують воду і сприяють утворенню більшої кількості склоподібної фази.

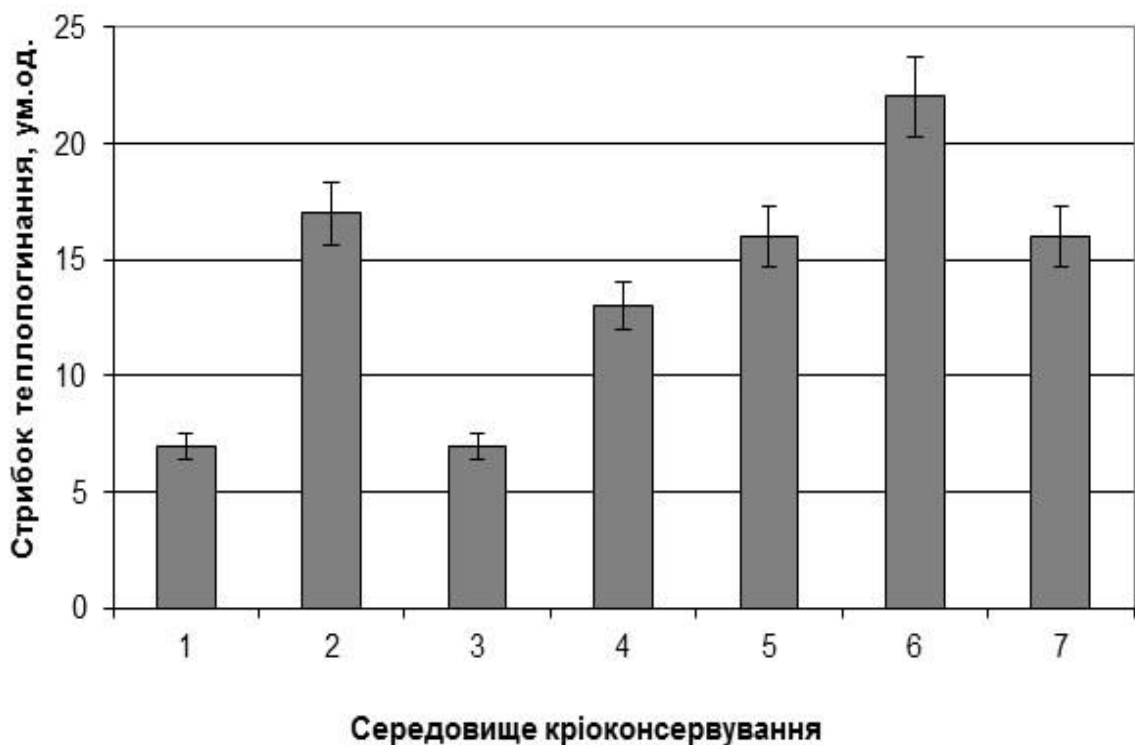


Рис. 3.2.2 Сtribок теплопоглинання при склуванні в суспензіях еритроцитів коня з однокомпонентними кріозахисними середовищами (1:1): 1 – 20% ПЕО-1500; 2 – 30% ПЕО-1500; 3 – 20% ДМСО; 4 – 25% ДМСО; 5 – 25% 1,2-ПД; 6 – 35% 1,2-ПД; 7 – 30% гліцерина.

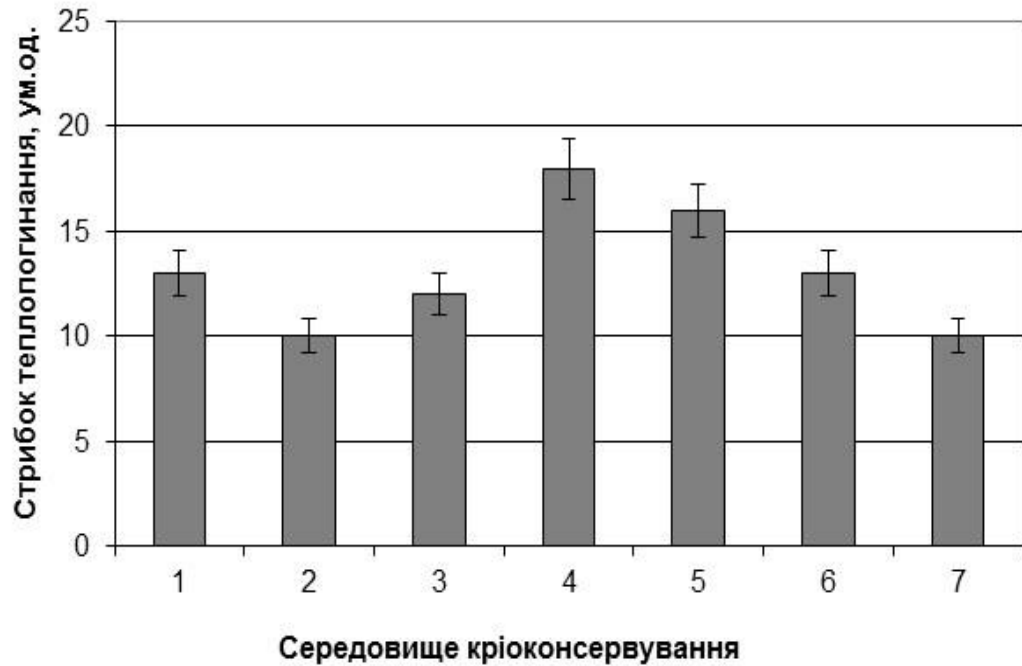


Рис. 3.2.3 Стрибок теплопоглинання при склуванні в суспензіях еритроцитів коня з комбінованими кріозахисними середовищами (1:1): 1 – 5% ПЕО-1500+15% ДМСО; 2 – 10% ПЕО-1500+10% ДМСО; 3 – 20% ПЕО-1500 +10% ДМСО; 4 – 10% ПЕО-1500 +10% ДМСО+10% 1,2-ПД+10% сахароза; 5 – 15% ПЕО-1500 + 10% ДМСО + 5% 1,2-ПД + 5% сахароза; 6 – 15% ПЕО-1500 + 15% ДМСО + 5% 1,2-ПД + 5% сахароза; 7 – 20% ПЕО-1500 + 10% ДМСО + 5% 1,2 ПД + 5% сахароза.

Відомо, що при збільшенні кількості склоподібної фази в зразку зменшується дія факторів кріоконсервування, пов'язаних з ростом кристалів льоду, гіперконцентрації солей, механічною напругою тощо [20, 44]. Тому потрібно вибирати середовища кріоконсервування з високою склоутворюючою здібністю. Але при підвищенні концентрації кріопротекторів можливо підвищення їх токсичної дії на біологічні об'єкти, тому успіх кріоконсервування безпосередньо залежить від дотримання балансу (збільшення концентрації кріопротектору для запобігання кристалізації і утворення максимальної кількості склоподібної фази) / (зменшення концентрації кріопротектору для запобігання його токсичної дії

на клітини), який підбирається для кожного типу клітин індивідуально. Саме тому, застосування комбінованих кріозахисних середовищ, які містять кріопротектори різного типу дії, є дуже перспективним, оскільки такі кріозахисні розчини є більш універсальними. У багатокомпонентних середовищах зменшується токсична дія окремих компонентів за рахунок відносно невисокій їх концентрації, а сумарна концентрація кріопротекторів дозволяє в деяких випадках досягти досить високої склоутворюючої дії і збереженості клітин.

Таким чином, в роботі визначені температури фазових переходів і склування в суспензіях еритроцитів коня з широко вживаними в кріобіології кріопротекторами: гліцерином, 1,2-ПД, ДМСО і ПЕО-1500, а також з комбінованими кріозахисними середовищами. Показано, що в присутності ПЕО-1500 температура склування на $30 \div 50$ °С вище, ніж при використанні інших досліджених кріопротекторів. Найнижча температура склування зареєстрована при охолодженні суспензій еритроцитів у присутності ДМСО. Сахароза перешкоджає розвитку кристалізації евтектичних складів, характерних для ПЕО-1500 і ДМСО. Рекомендована температура зберігання еритроцитів коня, бика і кролика в середовищах, які містять ПЕО-1500, ДМСО, 1,2-ПД і сахарозу нижче -95 °С, що достовірно вище температури рекомендованої температури зберігання при використанні однокомпонентного розчину ДМСО (нижче -125 °С). Тому комбіновані кріозахисні середовища є більш придатними для практичного використання. Застосування комбінованих кріозахисних середовищ дозволяє запобігти розвитку кристалізації евтектичних складів, характерних при застосуванні в кріозахисному складі тільки ПЕО-1500 або ДМСО, що дозволяє виключити один з можливих факторів кріопошкодження. Суспензії еритроцитів в кріоконсервуючому середовищі більш схильні до утворення аморфних фаз при охолодженні, ніж середовища, які не містять клітин.

За матеріалами розділу 3 опубліковано роботи [23 – 25].

РОЗДІЛ 4

ЗБЕРЕЖЕНІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ НА РІЗНИХ ЕТАПАХ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ У ПРИСУТНОСТІ КОМБІНОВАНИХ КРІОЗАХИСНИХ СЕРЕДОВИЩ

4.1 Оцінка флуоресцентними методами ефективності комбінування проникального і непроникального кріопротекторів при кріоконсервуванні еритроцитів бика, коня і кролика

На даний час у кріобіології широко застосовуються флуоресцентні методи аналізу клітин, проточна цитофлуориметрія та люмінесцентна мікроскопія із використанням флуоресцентних барвників, які реагують на зміну мікрооточення, мають високі сольватохромні показники і значне зростання квантового виходу під час зв'язування з біологічними об'єктами [135 – 138]. Так, флуоресцентний барвник 3-DAB – нейтральна речовина, яка практично не розчиняється у воді і чутлива до полярності оточення (сольватохромний ефект), має достатню гідрофобність для проникнення в біологічні об'єкти і нековалентного зв'язування з їх біомакромолекулами [137]. Важливо, що 3-DAB має високу фотохімічну стійкість і незначний квантовий вихід флуоресценції у водних середовищах, який у гідрофобній фазі різко збільшується, у концентраціях 10^{-4} – 10^{-3} М не виявляє токсичної дії на клітини [138]. У роботі було порівняно ефективність однокомпонентного і комбінованого кріозахисного середовища при кріоконсервуванні еритроцитів коня, бика і кролика із застосуванням флуоресцентних методів аналізу.

Виявлено, що використаний у роботі барвник 3-DAB добре забарвлює мембрани еритроцитів досліджених ссавців (рис. 4.1.1) і його можна використовувати для оцінки стану еритроцитів. Місце локалізації цього зонда в мембранах і внутрішньоклітинних структурах варіює залежно від мікрооточення молекул барвника.

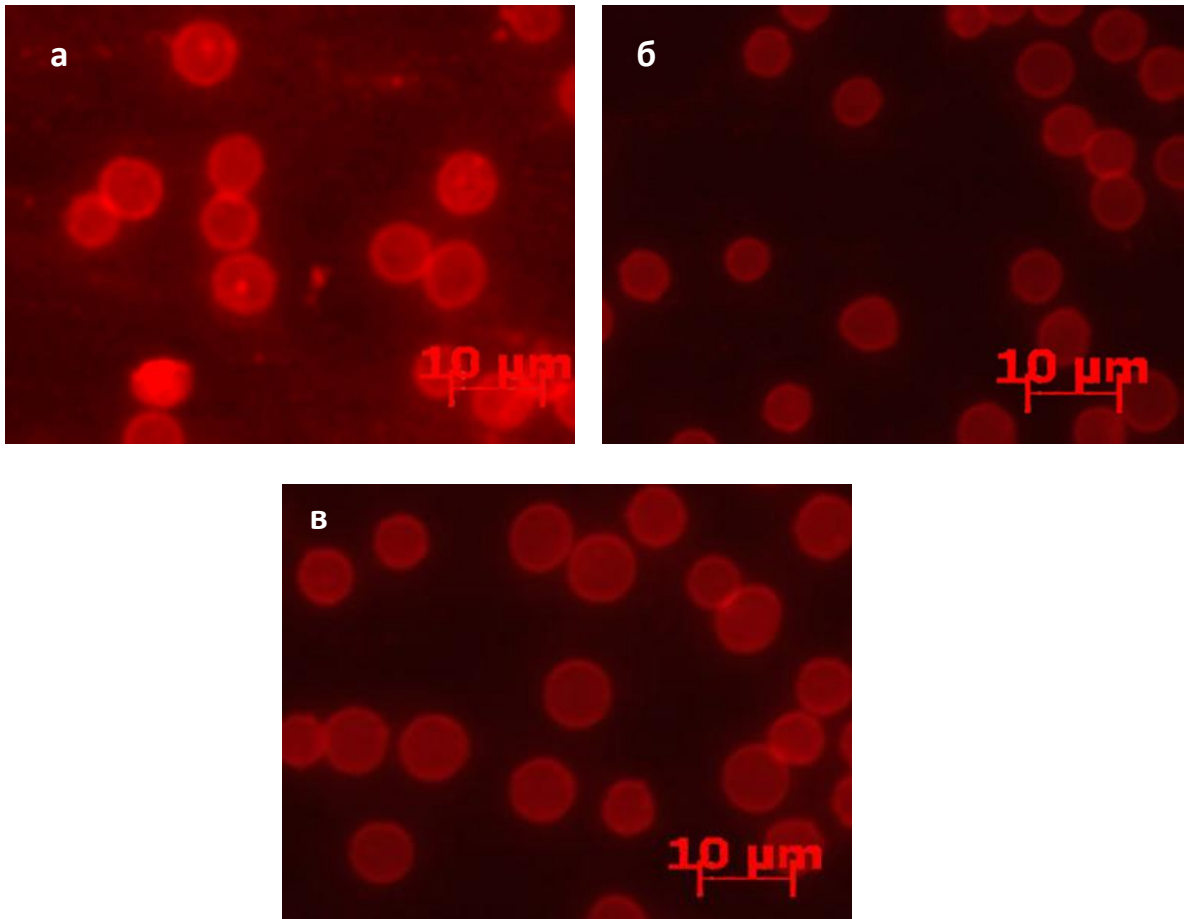


Рис. 4.1.1 Флуоресцентні зображення еритроцитів коня (а), бика (б) і кролика (в)

Автори робіт [137, 138], які використовували 3- DAB у якості зонда, висловили припущення, що молекули цього барвника, завдяки гідрофобним властивостям, повинні концентруватися на початку неполярної ділянки фосфоліпідів мембран клітин. Тому імовірним шляхом зв'язування з мембранними і внутрішньоклітинними структурами є нековалентний гідрофобний, місце локалізації – неполярні ділянки («кишені») біля макромолекул. Барвник 3-DAB частково проникає у внутрішньоклітинне середовище еритроцитів, дріжджів, сперматозоїдів людини, собак, крупної рогатої худоби тощо, але завдяки високому вмісту води, флуоресценція від молекул зонда з цієї області нехтовно мала.

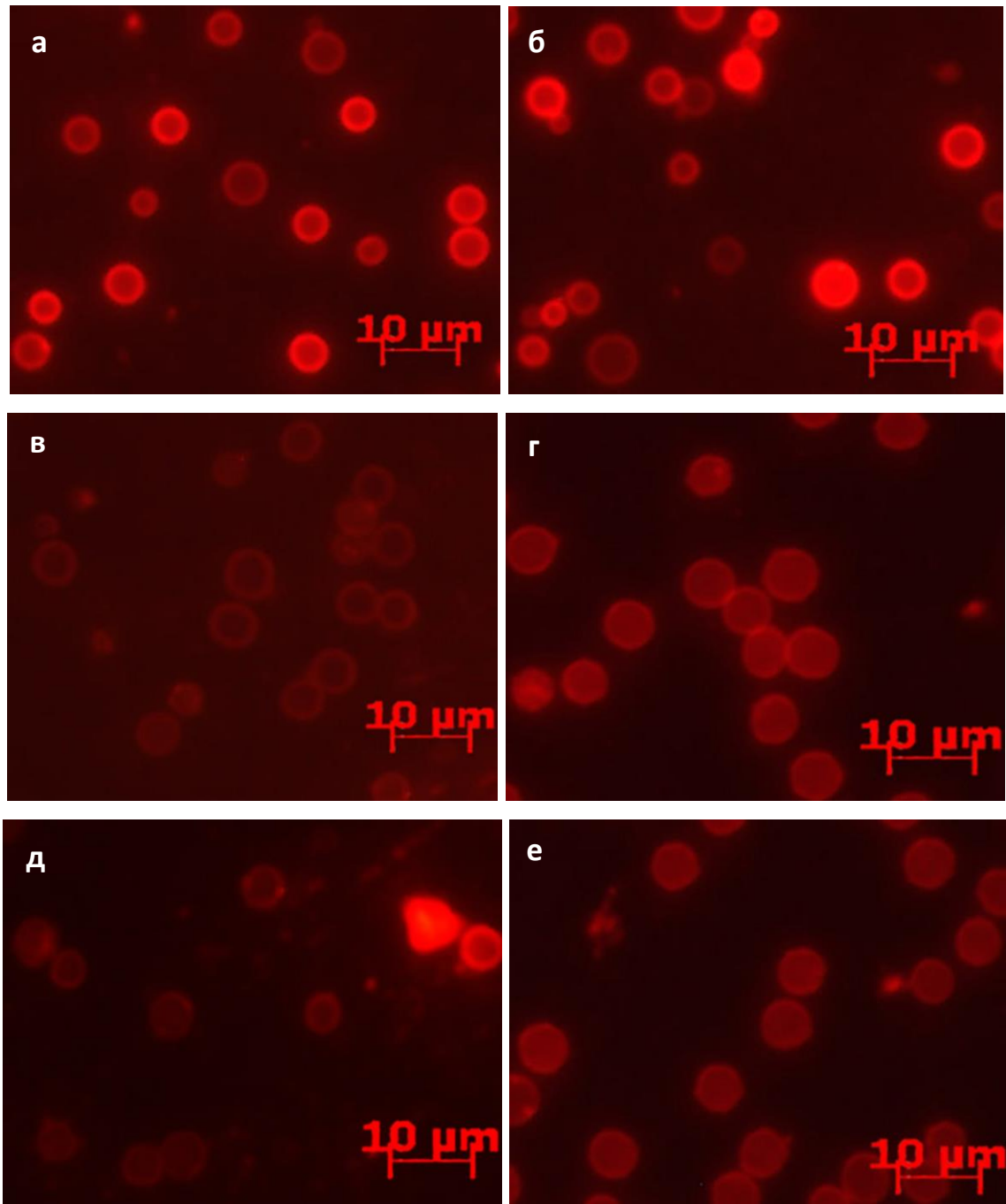


Рис. 4.1.2 Флуоресцентні зображення еритроцитів коня: а - після інкубування у розчині ДМСО; б - після заморожування-відігріву у розчині ДМСО; в - після заморожування-відігріву у розчині ДМСО і відмивання; г - після інкубування у розчині ДМСО і ПЕО-1500; д - після заморожування-відігріву у розчині ДМСО і ПЕО-1500; е - після заморожування-відігріву у розчині ДМСО і ПЕО-1500 і відмивання.

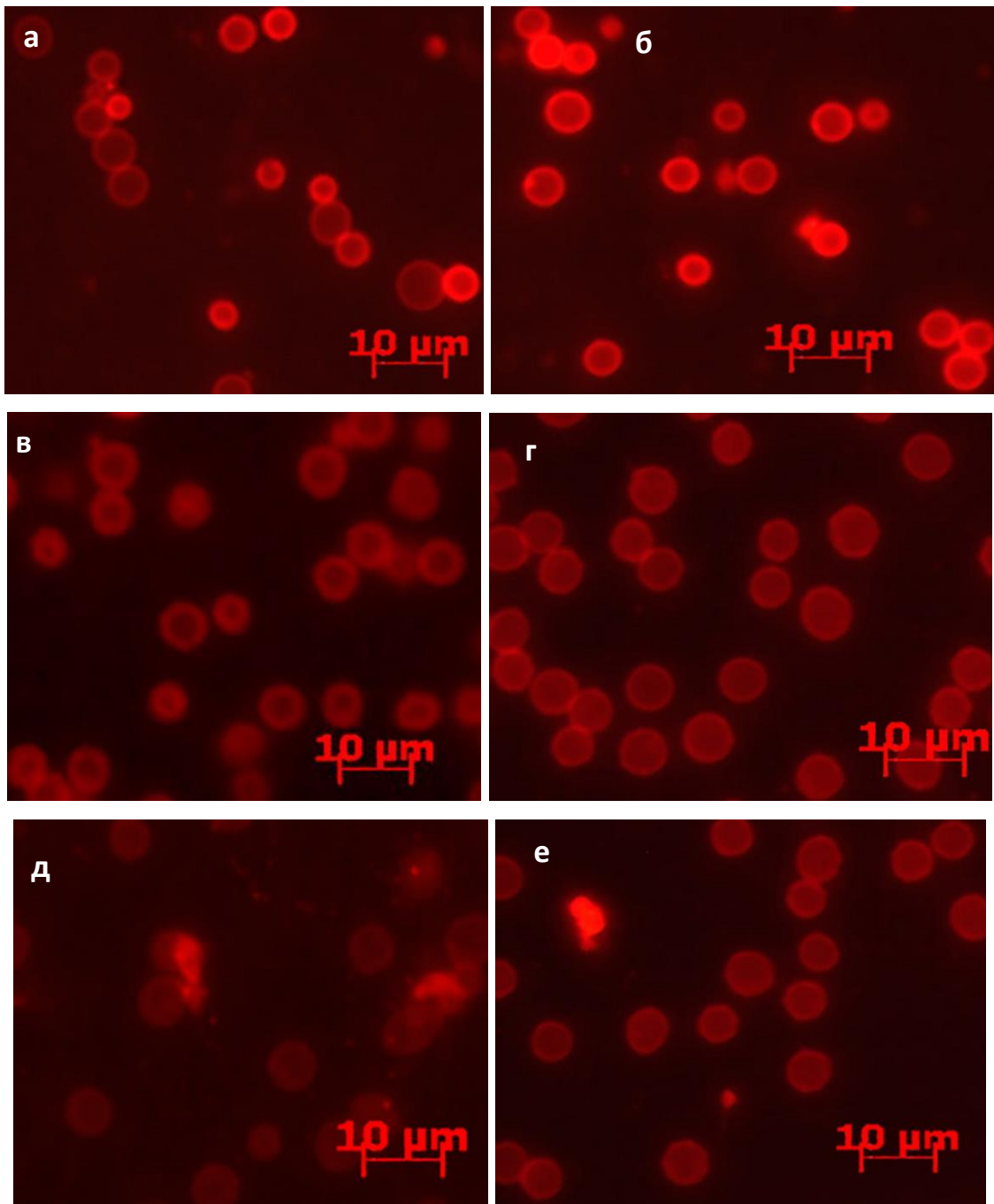


Рис. 4.1.3 Флуоресцентні зображення еритроцитів бика: а - після інкубування у розчині ДМСО; б - після заморожування-відігріву у розчині ДМСО; в - після заморожування-відігріву у розчині ДМСО і відмивання; г - після інкубування у розчині ДМСО і ПЕО-1500; д - після заморожування-відігріву у розчині ДМСО і ПЕО-1500; е - після заморожування-відігріву у розчині ДМСО і ПЕО-1500 і відмивання.

Після інкубації еритроцитів у розчині ДМСО спостерігається

посилення флуоресценції частини клітин і зменшення діаметру (рис. 4.1.2, а; 4.1.3, а). Такі зміни можуть бути пов'язані зі змінами форми клітин, близькими до сферичних, та збільшенню проникності мембран частини клітин для барвника у присутності ДМСО.

При збільшенні проникності мембран еритроцитів кількість гідрофобних місць зв'язування збільшується і, оскільки барвник 3-DAВ взаємодіє з біологічними структурами саме за гідрофобним механізмом, спостерігається суттєве зростання флуоресценції еритроцитів. Таке збільшення флуоресценція клітин при частковому пошкодженні мембран спостерігали автори роботи [138], при цьому повне пошкодження клітин приводило до гасіння флуоресценції водою.

Заморожування-відігрів еритроцитів коня і бика у однокомпонентному середовищі призводить до появи еритроцитів з досить однорідним яскравим забарвленням (рис. 4.1.2, б; 4.1.3, б). Імовірно, збільшення проникності мембран внаслідок їх пошкодження призводить до більш яскравого забарвлення клітин. Після всіх етапів кріоконсервування у розчині ДМСО (заморожування - відігрів - відмивання) серед еритроцитів коня не спостерігається клітин з яскравим забарвленням (рис. 4.1.2, в; 4.1.3, в). Імовірно, пошкоджені при заморожуванні клітини видаляються із суспензії при відмиванні від кріопротектора.

Додавання до суспензії еритроцитів коня і бика кріозахисного середовища, що містить кріопротектори різного типу дії (ДМСО і ПЕО-1500) не призводить до істотного посилення флуоресценції еритроцитарних мембран (рис. 4.1.2, г; 4.1.3, г), як це спостерігалось у розчині ДМСО. Це говорить про меншу мембранотропну дію комбінованого середовища, порівняно з середовищем, яке містить лише ДМСО. Після всіх етапів кріоконсервування у комбінованому середовищі (рис. 4.1.2, е; 4.1.3, е) стан еритроцитів суттєво не відрізняється від контрольної групи за розмірами та інтенсивністю флуоресценції мембран.

Аналіз еритроцитів коня і бика методом проточної цитофлуориметрії виявив істотні відмінності у розподіленні клітин у контролі (рис. 4.1.4, а, 4.1.5, а), які пов'язані, імовірно, з особливостями еритроцитів різних ссавців. Після інкубації еритроцитів коня і бика у розчині ДМСО на цитограмах цих клітин відмінності, які спостерігалися у контролі, менш помітні, що говорить про схожу дію кріопротектору на еритроцити даних ссавців (рис. 4.1.4, б, 4.1.5, б). На цитограмах еритроцитів коня і бика видно, що після заморожування-відігрівання еритроцитів достовірно збільшується кількість клітин в регіоні R1 (рис. 4.1.4, в, 4.1.5, в).

Відомо, що розподіл клітин на цитограмі змінюється при морфологічних змінах еритроцитів [157]. Так, автори роботи [142] при аналізі цитограм еритроцитів знайшли кореляцію між зсувом на діаграмі праворуч і збільшенням сферичності еритроцитів за даними мікроскопічних спостережень. Ці зміни еритроцитів були зворотними до досягнення точки гемолізу і при повертанні у ізотонічні умови форма більшості еритроцитів та їх цитограма поверталися до контрольних показників. Для еритроцитів коня, кріоконсервованих з ДМСО, на відміну від еритроцитів бика, цитограма за даними цитофлуориметричних досліджень, проведених в даній роботі, не відновлювалась навіть після відмивання від кріопротектору (рис. 4.1.4, г, 4.1.5, г). Це свідчить про незворотні зміни форми еритроцитів. Для ефективного переносу кисню еритроцитами вони повинні витримувати істотні деформації при проходженні через тонкі капіляри, діаметр яких у 2-3 рази менший за діаметр самих клітин [158]. Така висока ступінь деформабільності еритроцитів можлива завдяки їх двояковогнутої формі. Тому збереження нативної форми еритроцитів після кріоконсервування є необхідною умовою для подальшого успішного прогнозу після трансфузії суспензії кріоконсервованих клітин. А за відсутності збереження морфологічних характеристик еритроцитів після кріоконсервування не можна казати и про їх нормальну подальшу функціональну активність після трансфузії.

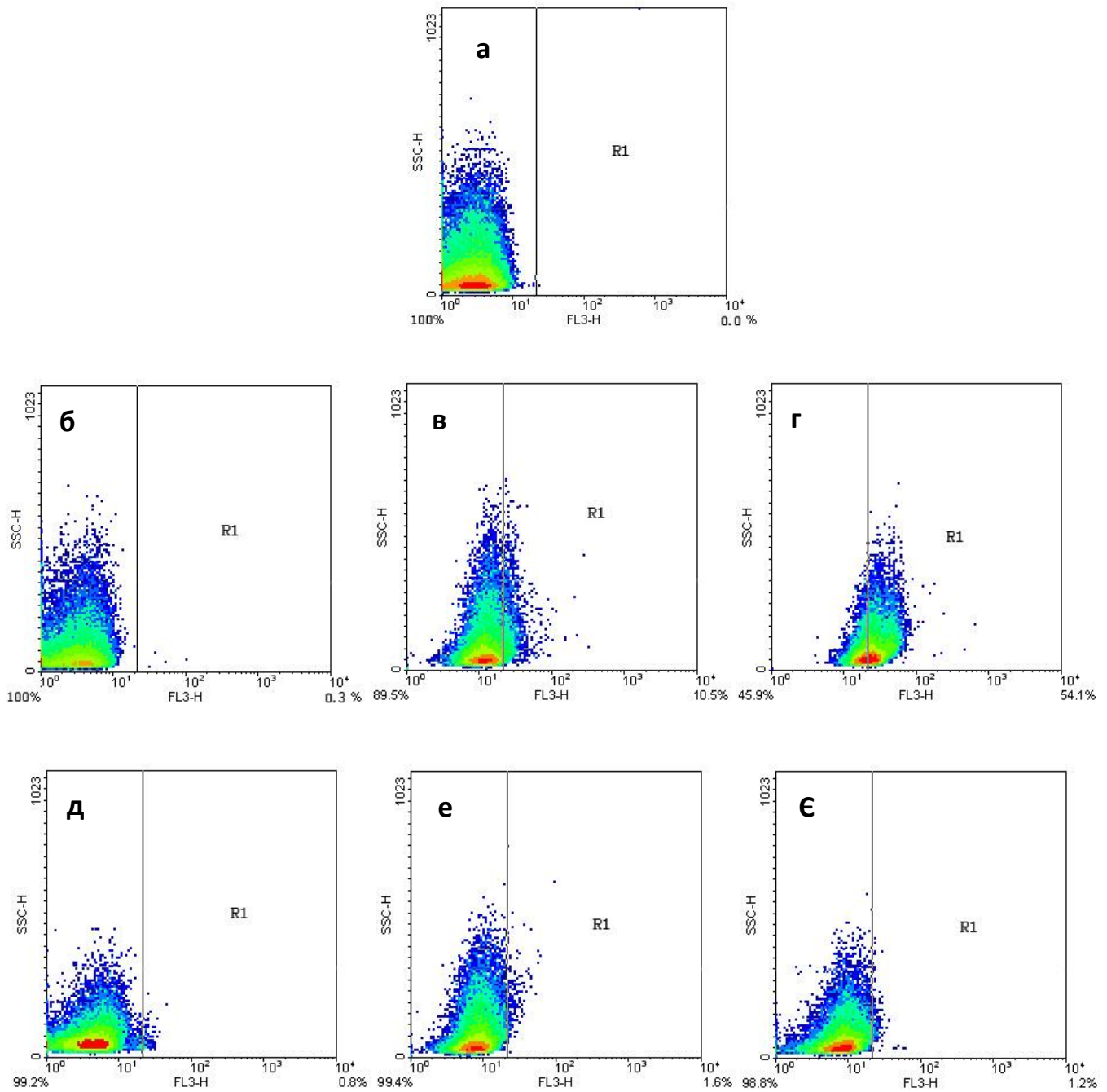


Рис. 4.1.4 Цитограми SSC/FL3-Н еритроцитів коня: а - контроль, б - після інкубування у розчині ДМСО; в - після заморожування-відігрівання у розчині ДМСО; г - після заморожування-відігрівання у розчині ДМСО і відмивання; д - після інкубування у розчині ДМСО і ПЕО-1500; е - після заморожування-відігрівання у розчині ДМСО і ПЕО-1500; є - після заморожування-відігрівання у розчині ДМСО і ПЕО-1500 і відмивання.

Після заморожування-відігріву еритроцитів коня і бика у присутності

комбінованого кріозахисного середовища зміни розподілу клітин на цитограмі менш виражені, ніж у розчині ДМСО (рис. 4.1.4, е, 4.1.5, е). Так після заморожування еритроцитів коня в розчині ДМСО спостерігається 10,5 % клітин в регіоні R1, а в присутності комбінованого розчину тільки 1,6 %. Розподіл відмитих після кріоконсервування еритроцитів коня і бика в комбінованому середовищі близький до контролю, а для еритроцитів коня з ДМСО зміщений праворуч.

Таким чином, встановлено, що однокомпонентне кріозахисне середовище на основі ДМСО недостатньо ефективно при кріоконсервуванні еритроцитів коня і більшість клітин, які збереглися після заморожування не відновлюють свої морфологічні характеристики. Авторами роботи [159] також виявлені істотні морфологічні зміни еритроцитів тварин при взаємодії з ДМСО. Еритроцити коня, бика і собаки при змішуванні з 20% розчином ДМСО (вихідна концентрація кріопротектору у розчині) набували форму неповної сфери з різною глибиною центральної ямки. Суспендування у 30% розчині ПЕО-1500 навпаки призводило до сплюснення еритроцитів, що пов'язане з зневодненням і агрегацією клітин. Після розморожування еритроцитів, кріоконсервованих з ДМСО, майже всі клітини були ехіноцитарної форми, а з ПЕО-1500 – стоматоцитарної. Комбінування проникального і непроникального кріопротектору, яке досліджено у даній роботі, імовірно, приводе до компенсації цих змін, і менша концентрація кожного кріопротектору знижує токсичність розчину у цілому.

У роботах [14, 160] виявлено, що заморожування еритроцитів тварин у присутності ПЕО-1500 дозволяє отримати низький рівень гемолізу. Так, для еритроцитів коня одразу після розморожування він був біля 1%. Але подальше моделювання трансфузії (без відмивання ПЕО-1500) призводило до різкого збільшення гемолізу до 25-38% для еритроцитів різних тварин. Висловлено припущення, що висока ефективність ПЕО-1500 при заморожуванні еритроцитів [143] може пояснюватися цілим рядом

адаптивних перебудов в клітинах, які дозволяють їм вижити в процесі кріоконсервування.

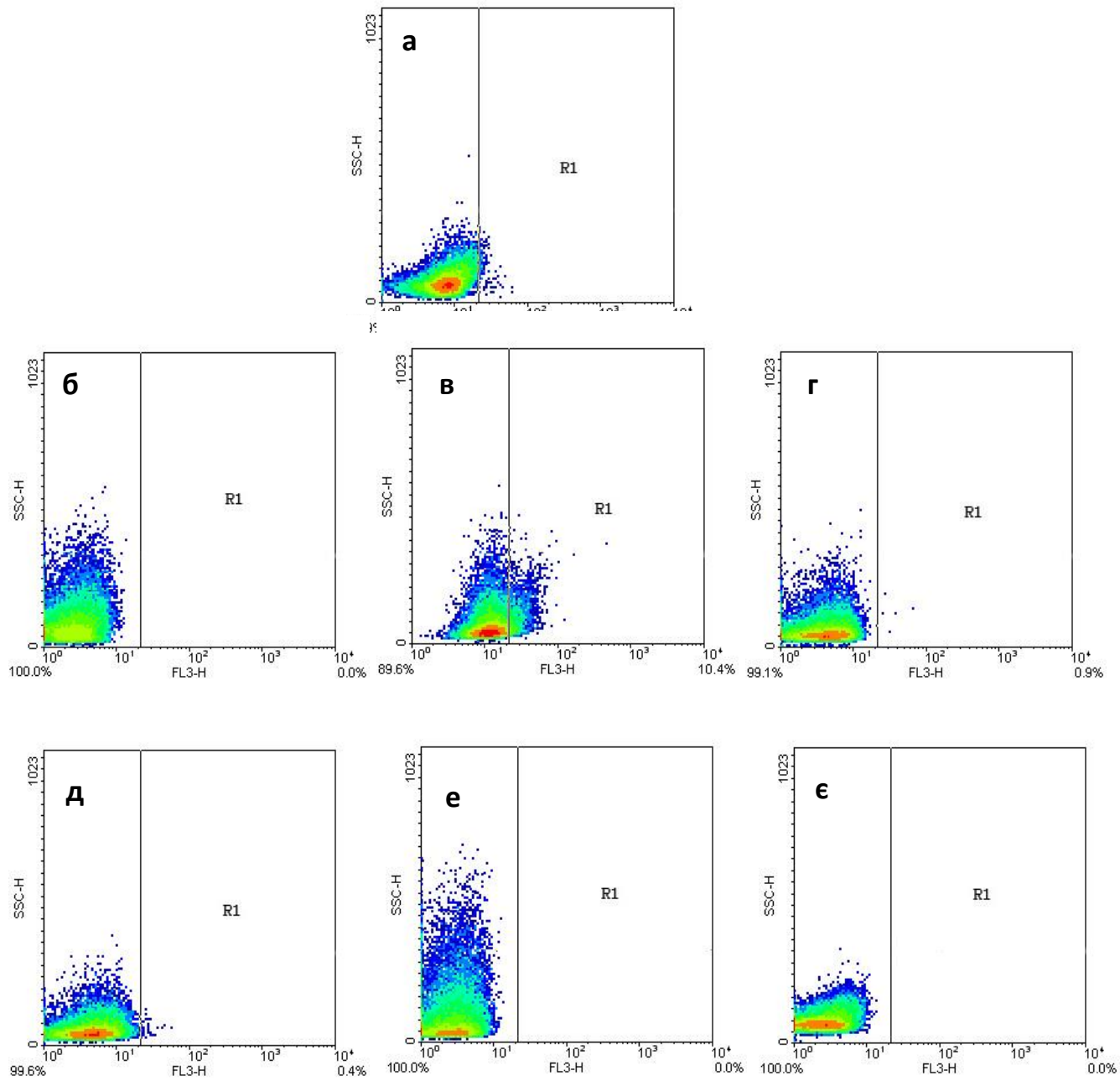


Рис. 4.1.5 Цитограми SSC/FL3-H еритроцитів бика: а - контроль, б - після інкубування у розчині ДМСО; в - після заморожування-відігрівання у розчині ДМСО; г - після заморожування-відігрівання у розчині ДМСО і відмивання; д - після інкубування у розчині ДМСО і ПЕО-1500; е - після заморожування-відігрівання у розчині ДМСО і ПЕО-1500; є - після заморожування-відігрівання у розчині ДМСО і ПЕО-1500 і відмивання.

Асиметричне трансмембранне розподілення фосфоліпідів є основою для нормального функціонування мембрани і клітини в цілому. Перебудови у ліпідній організації мембрани, які здійснюються під впливом кріопротектору, а також опосередковані зміни білок-білкових і білок-ліпідних взаємодій у процесі кріоконсервування можуть призводити до порушення асиметричного розподілення фосфоліпідів у мембрані. В еритроцитах коня виявлено дефіцит білка полоси 4.2, який грає важливу роль у стабілізації клітин [161]. Тому краща збереженість при кріоконсервуванні еритроцитів у середовищі, яке містить ПЕО-1500 може забезпечуватися завдяки модифікації мембрано-цитоскелетного комплексу під впливом даного кріопротектору. При цьому присутність у середовищі кріоконсервування для еритроцитів коня проникального кріопротектору ДМСО дозволяє зменшити зневоднення клітин на етапі інкубації і, відповідно знизити їх пошкодження на етапі регідратації при переведенні в ізотонічні умови.

Для відмитих після кріоконсервування під захистом ДМСО еритроцитів бика не спостерігалось подібного для еритроцитів коня зміщення на цитограмі праворуч і збільшення кількості клітин у регіоні R1 (рис. 4.1.5, г). Це говорить про те, що після відмивання від ДМСО відновлювались параметри клітин, які пережили заморожування. Авторами роботи [14] отримано дані про більший рівень гемолізу еритроцитів коня при кріоконсервуванні з 10% ДМСО, ніж еритроцитів бика і собаки. При кріоконсервуванні з ПЕО-1500 гемоліз у еритроцитах коня був навпаки менший. Це говорить про чутливість еритроцитів коня саме до специфічної токсичної дії ДМСО.

У роботі В.Р. Best показано, що ДМСО у подібних концентраціях чинить токсичну дію [162]. Причому окрім осмотичних ефектів наявна пряма блокувальна дія молекул ДМСО на білки мембранних каналів. При цьому гідрофільність ДМСО та його здатність дестабілізувати конформацію білка збільшується зі зростанням температури. Крім цього, для ДМСО є

характерним специфічний вид токсичності - клітинна мембранна токсичність [162].

Ліпідний бішар плазматичної мембрани еритроцитів ссавців складається з гідрофільних груп полярних голів на зовнішніх і внутрішніх поверхнях з ланцюгами гідрофобних жирних кислот в середину мембрани. Здатність молекул проникати через клітинні мембрани зростає при збільшенні їх гідрофобності, але зменшується зі збільшенням молекулярного розміру або гідрофільності.

Тривалість життя водневого зв'язку в системі ДМСО-вода у кілька разів більша життя вода-вода водневого зв'язку. Сульфініл (SO) кисень ДМСО водневій зв'язки з водою більш сильні (близько 30 кДж/моль), ніж молекул води водневій зв'язки один до одного (близько 20 кДж/моль). Зв'язок ДМСО з водою зменшується зі зростанням температури [163].

При цьому комбінація кріопротекторів різного типу дії дозволяє знизити концентрацію кожного з них у розчині і, відповідно знизити їх токсичну дію. При цьому зберігається достатня сумарна концентрація кріозахисних сполук для модифікації структури води при заморожуванні [164].

Ефективність комбінованого кріопротектору було також оцінено при кріоконсервуванні еритроцитів кролика. Виявлено, що як після інкубації у комбінованому середовищі, так і після всіх етапів кріоконсервування флуоресцентні зображення клітин близькі до контрольних (рис. 4.1.6), що говорить про високу ефективність комбінованого середовища для еритроцитів кролика. Показано, що заморожування у комбінованому середовищі не призводить до істотних відмінностей у розподіленні клітин на цитограмах (рис. 4.1.7), що підтверджує високу ефективність комбінації проникального і непроникального кріопротектору для кріоконсервування еритроцитів кролика.

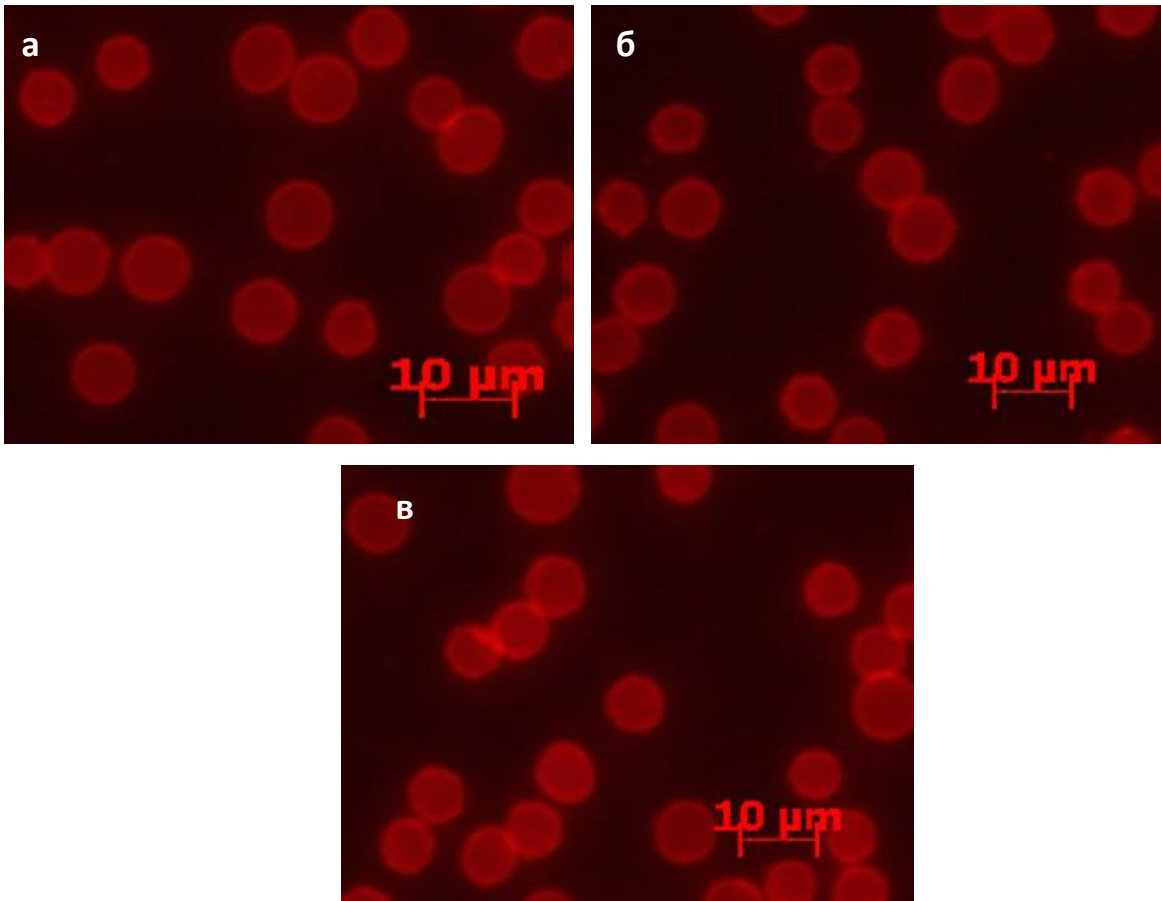


Рис. 4.1.6 Флуоресцентні зображення еритроцитів кролика: а - контроль; б - після інкубування у розчині ДМСО і ПЕО-1500; в - після заморожування-відігріву у розчині ДМСО і ПЕО-1500 і відмивання.

Таким чином, флуоресцентний барвник 3-DAV забарвлює мембрани еритроцитів коня, бика і кролика. При дії пошкоджуючих факторів кріоконсервування мембрани частини еритроцитів набувають більш пухку структуру і кількість гідрофобних місць зв'язування зонда збільшується, що призводить до збільшення флуоресценції клітин з пошкодженими мембранами. Це робить можливим успішно застосовувати флуоресцентний барвник 3-DAV у проточно-цитофлуориметричному аналізі та флуоресцентній мікроскопії для оцінки стану еритроцитів тварин на різних етапах кріоконсервування.

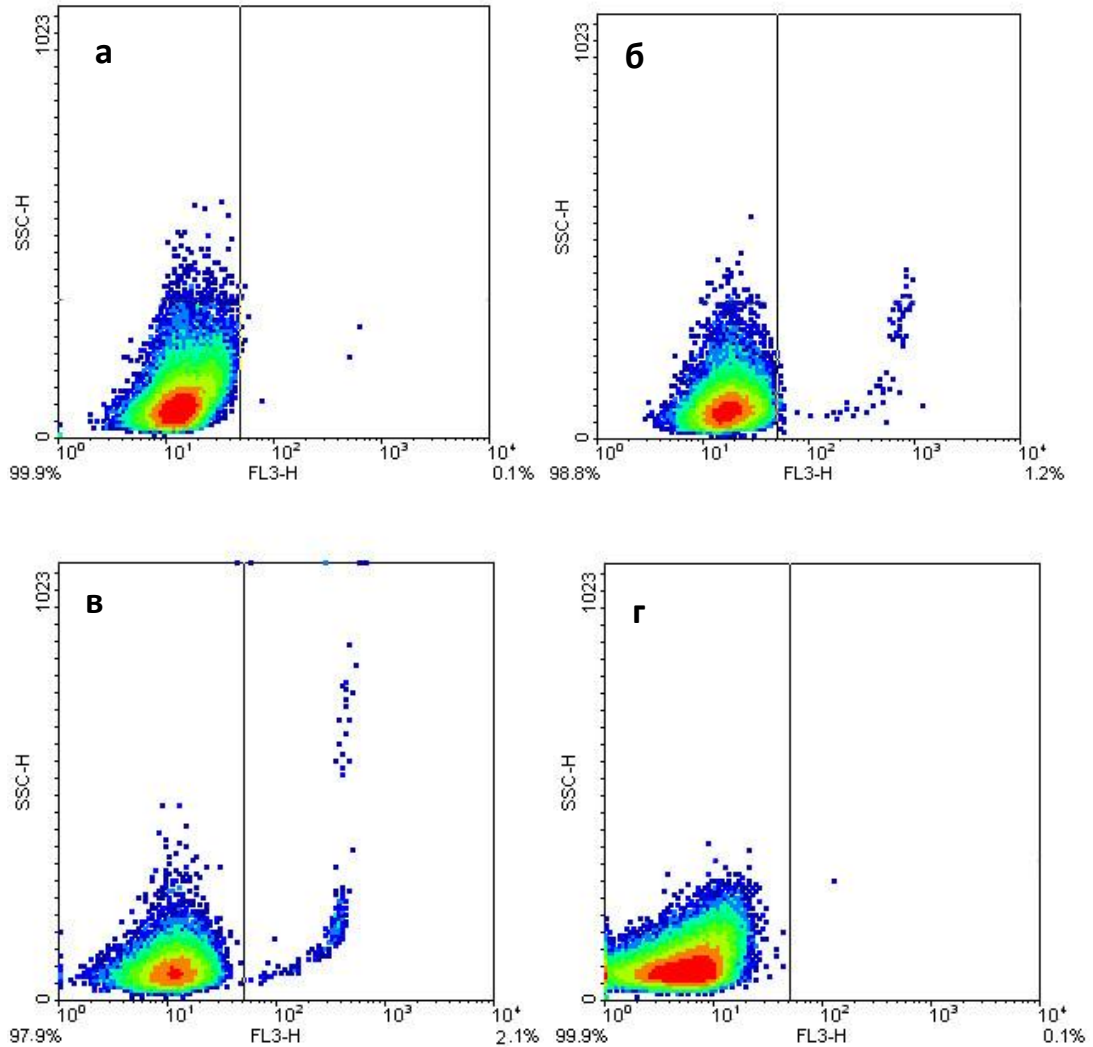


Рис. 4.1.7 Цитограми SSC/FL3-H еритроцитів бика: а - контроль, б - після інкубування у розчині ДМСО і ПЕО-1500; в - після заморожування-відігрівання у розчині ДМСО і ПЕО-1500; г - після заморожування-відігрівання у розчині ДМСО і ПЕО-1500 і відмивання.

Виявлено, що при консервуванні еритроцитів коня і бика у комбінованому кріозахисному середовищі не тільки знижуються загальні втрати клітин у порівнянні з розчином ДМСО, але й також еритроцити, які збереглися після всіх етапів кріоконсервування більш близькі до контрольних. Це особливо актуально для еритроцитів коня, які більш чутливі

до пошкоджуючих кріобіологічних факторів. Комбіноване середовище є також ефективним при кріоконсервуванні еритроцитів кролика.

4.2 Вплив складу кріоконсервуючого середовища на гемоліз еритроцитів ссавців на різних етапах кріоконсервування

Дія факторів кріоконсервування може призводити до розвитку трансмембранних дефектів, виникнення великих пір, розривів і, як наслідок, гемолізу еритроцитів [14, 145]. Саме рівень гемолізу є показником відсотку загиблих на різних етапах кріоконсервування еритроцитів.

У розділі 4.1 було показано високу ефективність комбінації проникального і непроникального кріопротекторів, таких як ДМСО та ПЕО-1500. Далі проводився підбір оптимальних концентрацій цих кріопротекторів, а також оцінка можливості підвищення ефективності кріозахисного середовища шляхом додавання до нього 1,2-ПД і сахарози. Ефективність комбінованих кріозахисних середовищ при заморожуванні еритроцитів бика, коня і кролика оцінювали за рівнем гемолізу. У таблицях 4.2.1, 4.2.2 і 4.2.3 наведені дані щодо гемолізу еритроцитів досліджених ссавців після інкубації в кріозахисному середовищі, після низькотемпературного впливу і подальшої процедури відмивання та переведення клітин в ізотонічне середовище.

Після низькотемпературного впливу рівень гемолізу максимально зростає в суспензіях еритроцитів бика, кролика і коня змішаних із середовищем (5% ПЕО-1500+15% ДМСО) і мінімально - із середовищами (15% ПЕО-1500 + 10% ДМСО + 5% 1,2-ПД + 5% сахарози) та (20% ПЕО-1500 + 10% ДМСО + 5% 1,2-ПД + 5% сахарози). Так після заморожування в середовищі (15% ПЕО-1500 + 10% ДМСО + 5% 1,2-ПД + 5% сахарози) гемоліз еритроцитів бика становить всього 5,2%, кролика - 6,4%, а коня - 7,2%.

Таблиця 4.2.1

Рівень гемолізу еритроцитів бика в процесі кріоконсервування з
різними комбінованими середовищами

Середовище	Гемоліз, %		
	Інкубація	Заморожування - відігрів	Заморожування - відігрів - відмивання
5% ПЕО-1500+15% ДМСО	0,8±0,2	18,4±1,3	38,2±2,5
10% ПЕО-1500 +10% ДМСО	0,7±0,2	13,8±1,2	46,2±4,1
20% ПЕО-1500+10% ДМСО	0,5±0,2	13,2±1,1	35,5±2,4
10% ПЕО-1500 + 10% ДМСО + 10% 1,2-ПД + 10% сахарози	0,6±0,2	10,4±1,0	38,4±2,7
15% ПЕО-1500 + 10% ДМСО + 5% 1,2-ПД + 5% сахарози	0,5±0,2	5,2±0,4	23,4±2,0
15% ПЕО-1500 + 15% ДМСО + 5% 1,2-ПД + 5% сахарози	0,8±0,1	7,2±0,8	27,5±2,3
20% ПЕО-1500 + 10% ДМСО + 5% 1,2-ПД + 5% сахарози	0,5±0,2	5,2±0,6	41,1±4,0
10% ПЭГ-1500 + 10% ДМСО + 10% 1,2-ПД +5% сахарози	0,5±0,1	13,8±1,1	47,3±4,1
20% ПЭГ-1500 + 5% ДМСО +5% 1,2-ПД +5% сахарози	0,3±0,2	6,6±0,5	30,9±2,3
10%ПЭГ-1500 + 10%ДМСО + 10% 1,2-ПД+ 10% манніт	0,6±0,1	10,0±0,5	38,5±3,4

З отриманих даних видно, що рівень гемолізу після інкубації еритроцитів усіх ссавців у багатокомпонентних середовищах не перевищує

1%, що говорить про толерантне ставлення цих клітин до кріопротекторів при концентраціях використаних в даній роботі.

Таблиця 4.2.2

Рівень гемолізу еритроцитів кролика в процесі кріоконсервування з різними комбінованими середовищами

Середовище	Гемоліз, %		
	Інкубація	Заморожування - відігрів	Заморожування - відігрів - відмивання
5% ПЕО-1500+15% ДМСО	0,8±0,2	16,4±1,4	46,9±3,9
10% ПЕО-1500 +10% ДМСО	0,7±0,2	15,8±1,6	48,5±4,2
20% ПЕО-1500+10% ДМСО	0,4±0,3	15,4±1,3	36,5±2,5
10% ПЕО-1500 + 10% ДМСО + 10% 1,2-ПД + 10% сахарози	0,5±0,1	11,4±1,1	40,4±3,5
15% ПЕО-1500 + 10% ДМСО + 5% 1,2-ПД + 5% сахарози	0,8±0,2	6,4±0,5	24,5±2,1
15% ПЕО-1500 + 15% ДМСО + 5% 1,2-ПД + 5% сахарози	0,9±0,1	7,8±0,2	28,9±2,8
20% ПЕО-1500 + 10% ДМСО + 5% 1,2-ПД + 5% сахарози	0,6±0,2	6,7±0,6	43,8±4,2
10% ПЭГ-1500 + 10% ДМСО + 10% 1,2-ПД +5% сахарози	0,6±0,1	15,5±1,3	49,5±3,4
20% ПЭГ-1500 + 5% ДМСО +5% 1,2-ПД +5% сахарози	0,4±0,2	7,3±0,8	32,7±2,2
10%ПЭГ-1500 + 10%ДМСО + 10% 1,2-ПД+ 10% манніт	0,7±0,2	9,2±0,5	40,7±3,8

Після процедури видалення кріопротекторів і перенесення в ізотонічне середовище рівень гемолізу суттєво зростає для всіх досліджених середовищ, проте із середовищем (15% ПЕО-1500 + 10% ДМСО + 5% 1,2-ПД + 5% сахарози) вдається отримати 74 ÷ 76% збережених еритроцитів досліджених ссавців.

Таблиця 4.2.3

Рівень гемолізу еритроцитів коня в процесі кріоконсервування з різними комбінованими середовищами

Середовище	Гемоліз, %		
	Інкубація	Заморожування - відігрів	Заморожування - відігрів - відмивання
5% ПЕО-1500+15% ДМСО	0,8±0,2	16,7±1,5	45,8±3,7
10% ПЕО-1500 +10% ДМСО	0,3±0,1	16,2±0,9	51,2±5,1
20% ПЕО-1500+10% ДМСО	0,7±0,2	16,5±1,2	39,5±2,7
10% ПЕО-1500 + 10% ДМСО + 10% 1,2-ПД + 10% сахарози	0,5±0,2	12,5±1,2	44,3±3,2
15% ПЕО-1500 + 10% ДМСО + 5% 1,2-ПД + 5% сахарози	0,7±0,2	7,2±0,6	25,4±2,0
15% ПЕО-1500 + 15% ДМСО + 5% 1,2-ПД + 5% сахарози	0,9±0,3	7,6±0,5	27,8±2,7
20% ПЕО-1500 + 10% ДМСО + 5% 1,2-ПД + 5% сахарози	0,5±0,2	6,1±0,5	42,2±3,8
10% ПЭГ-1500 + 10% ДМСО + 10% 1,2-ПД +5% сахарози	0,6±0,2	15,8±1,4	54,5±3,5
20% ПЭГ-1500 + 5% ДМСО +5% 1,2-ПД +5% сахарози	0,3±0,2	7,7±0,7	34,9±2,8
10%ПЭГ-1500 + 10%ДМСО + 10% 1,2-ПД+ 10% манніт	0,6±0,1	8,1±0,5	44,8±3,9

З отриманих даних видно, що незначна добавка в середовище сахарози дозволяє істотно зменшити гемоліз еритроцитів при заморожуванні. Використання ДМСО при концентрації в суспензії вище 5% призводить до достовірного підвищення рівня гемолізу ще на етапі інкубації. Підвищення концентрації ПЕО-1500 дозволяє істотно знизити рівень гемолізу еритроцитів на етапі заморожування - відігріву. Однак спостерігається різке зростання рівня гемолізу на етапі видалення криопротектору. Так, наприклад, після заморожування еритроцитів під захистом криозахисного середовища (20% ПЕО-1500 + 10% ДМСО + 5% 1,2-ПД + 5% сахарози) рівень гемолізу становить 5,2% для еритроцитів бика, 6,4% - еритроцитів коня і 7,2% - еритроцитів кролика, а при відмиванні криопротектору цей показник зростає до 41,1, 42,2 і 43,8%, відповідно. Це може бути пов'язано з «налипанням» молекул криопротектору ПЕО-1500 на пошкоджені частини мембран, а відмивання від нього веде до відкриття пори і виходу гемоглобіну.

Таким чином, застосування багатокомпонентного криозахисного середовища, яке містить проникальні і непроникальні криопротектори (15% ПЕО-1500, 10% ДМСО, 5% 1,2 ПД, 5% сахарози) дозволяє отримати до 75% збережених еритроцитів бика, кролика і коня.

Використання комбінованих криозахисних середовищ з проникальними і непроникальними криопротекторами у складі більш ефективно при криоконсервуванні багатьох біологічних об'єктів. Метою наступної частини роботи було порівняти ефективність розробленого нами комбінованого і відомих однокомпонентних криоконсервуючих середовищ при криоконсервуванні еритроцитів бика, коня, кролика, а також оцінити його ефективність при криоконсервуванні еритроцитів людини.

Еритроцити людини найчастіше зберігаються під захистом середовища ЦНІГПК 11₄, який містить 30% гліцерину та 4% маніту. Є дані про застосування методики на основі гліцерину для криоконсервування еритроцитів собаки [165]. Як видно з рис. 4.2.1, застосування середовища на основі гліцерина для еритроцитів людини дійсно дає хороші результати на

всіх стадіях кріоконсервування. Порівняно з ним, лише розроблене нами комбіноване середовище з 15% ПЕО-1500, 10% ДМСО, 5% 1,2 -ПД, 5% сахарози дає кращі результати як відразу після заморожування-відігріву, так і після всіх етапів кріоконсервування.

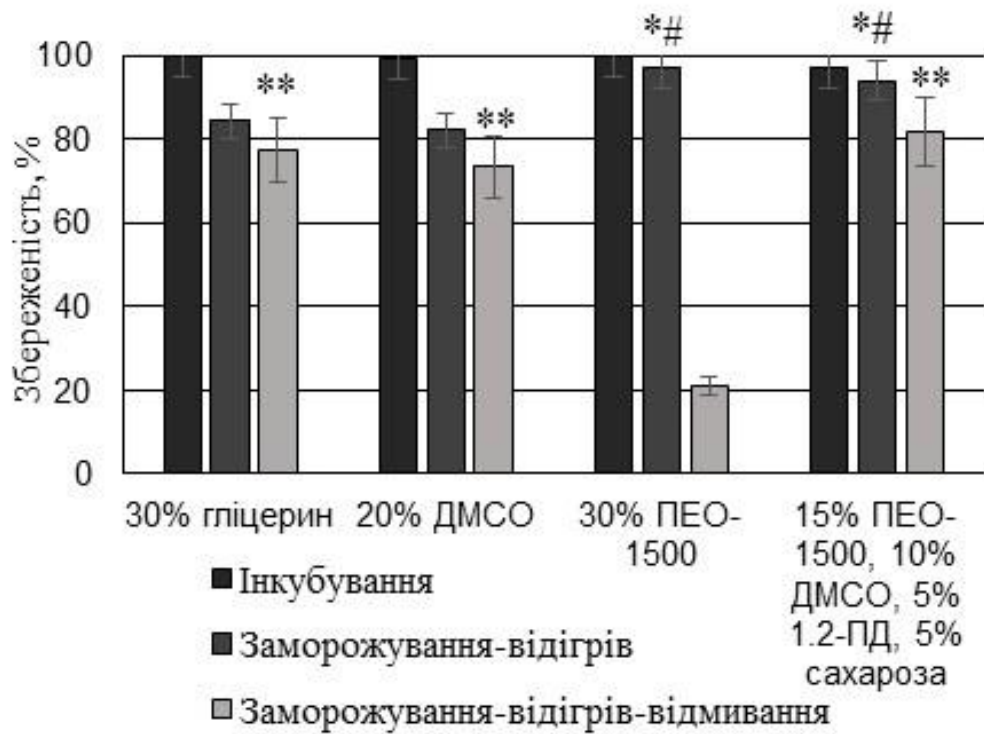


Рис. 4.2.1 Збереженість еритроцитів людини на різних етапах кріоконсервування з однокомпонентними та комбінованими середовищами.

* - статистично значущі відмінності порівняно з кріопротекторним розчином 30% гліцерину, 4% маніту ($p < 0,05$), $n = 6$; # - статистично значущі відмінності порівняно з 20% розчином ДМСО ($p < 0,05$), $n = 6$; ** - статистично значущі відмінності порівняно з 30% розчином ПЕО-1500 ($p < 0,05$), $n = 6$.

Отримані результати свідчать про те, що комбіноване кріозахисне середовище може бути більш ефективною альтернативою гліцериновому середовищу при кріоконсервуванні донорських еритроцитів.

При кріоконсервуванні еритроцитів коня ефективність середовища з гліцерином значно нижча, ніж для еритроцитів людини (рис. 4.2.2). Оскільки на стадії інкубації з цим середовищем збереження еритроцитів коня майже 100%, низька ефективність гліцерину при низькій температурі може не бути наслідком його токсичності для цих клітин. Можливо, отримані відмінності зумовлені різною проникальністю мембран еритроцитів коня та людини для молекул гліцерину.

Найкращі серед однокомпонентних кріозахисних середовищ результати після всіх етапів кріоконсервування еритроцитів коня були отримані з розчином ДМСО, що підтверджує дані, отримані авторами роботи [32]. Найвища збереженість еритроцитів коня відразу після заморожування-відігріву була отримана під захистом ПЕО-1500. Цей високомолекулярний непроникальний кріопротектор викликає дегідратацію клітин на стадії інкубації, запобігаючи тим самим внутрішньоклітинної кристалізації; у той час як висока концентрація кріопротектора у позаклітинному середовищі достатня для зв'язування значної частини вільної води, що призводить до пригнічення процесів позаклітинної кристалізації та зменшення пошкодження мембрани еритроцитів кристалами льоду [21]. Однак на стадії відмивання еритроцитів від ПЕО-1500 майже всі клітини знищуються. Можливі безвідмивні методи кріоконсервування еритроцитів під захистом ПЕО-1500, однак, при моделюванні трансфузії еритроцитів гемоліз різко зростатиме через різку зміну осмолярності позаклітинного середовища.

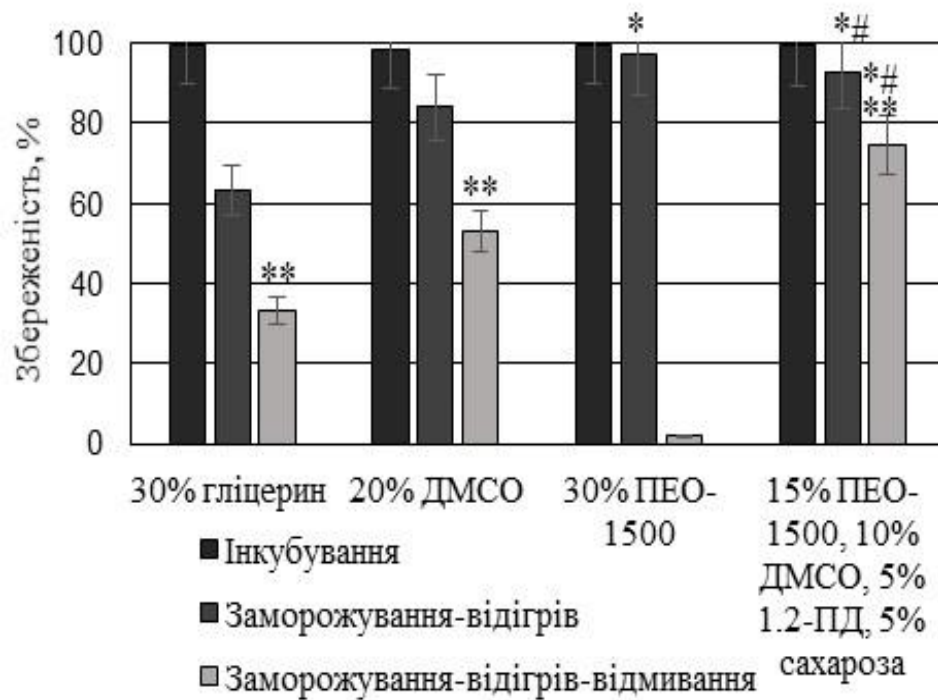


Рис. 4.2.2 Збереженість еритроцитів коня на різних етапах кріоконсервування з однокомпонентними та комбінованими середовищами.

* - статистично значущі відмінності порівняно з кріопротекторним розчином 30% гліцерину, 4% маніту ($p < 0,05$), $n = 6$; # - статистично значущі відмінності порівняно з 20% розчином ДМСО ($p < 0,05$), $n = 6$; ** - статистично значущі відмінності порівняно з 30% розчином ПЕО-1500 ($p < 0,05$), $n = 6$.

Використання комбінованого середовища дозволяє значно підвищити збереженість еритроцитів коня після всіх етапів кріоконсервування порівняно з іншими середовищами (рис. 4.2.2).

При кріоконсервуванні еритроцитів бика найнижчий рівень збереженості клітин на всіх етапах кріоконсервування виявлено з гліцериновим середовищем (рис. 4.2.3). Це може бути пов'язано з низькою проникальністю мембран еритроцитів бика для гліцерину та токсичною дією даного кріопротектору на клітини.

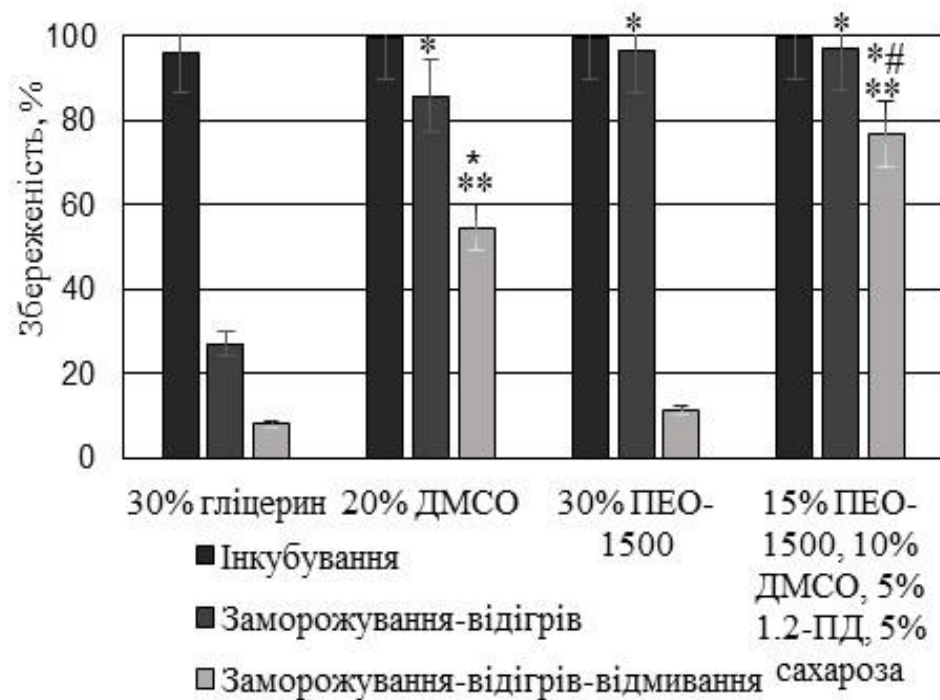


Рис. 4.2.3 Збереженість еритроцитів бика на різних етапах кріоконсервування з однокомпонентними та комбінованими середовищами.

* - статистично значущі відмінності порівняно з кріопротекторним розчином 30% гліцерину, 4% маніту ($p < 0,05$), $n = 5$; # - статистично значущі відмінності порівняно з 20% розчином ДМСО ($p < 0,05$), $n = 6$; ** - статистично значущі відмінності порівняно з 30% розчином ПЕО-1500 ($p < 0,05$), $n = 6$.

Як і для еритроцитів коня найкращі результати отримано з комбінованим середовищем, яке містить кріопротектори екзо- та ендоцелюлярної дії. Збереженість еритроцитів одразу після заморожування-відігрівання складає 96,8%. Процедура відмивання від кріопротектору призводить до втрати частини клітин, але збереженість еритроцитів все ж досить висока і складає 76,6%.

Ефективність середовища з гліцерином при кріоконсервуванні еритроцитів кролика близька до ефективності середовища з ДМСО (рис. 4.2.4).

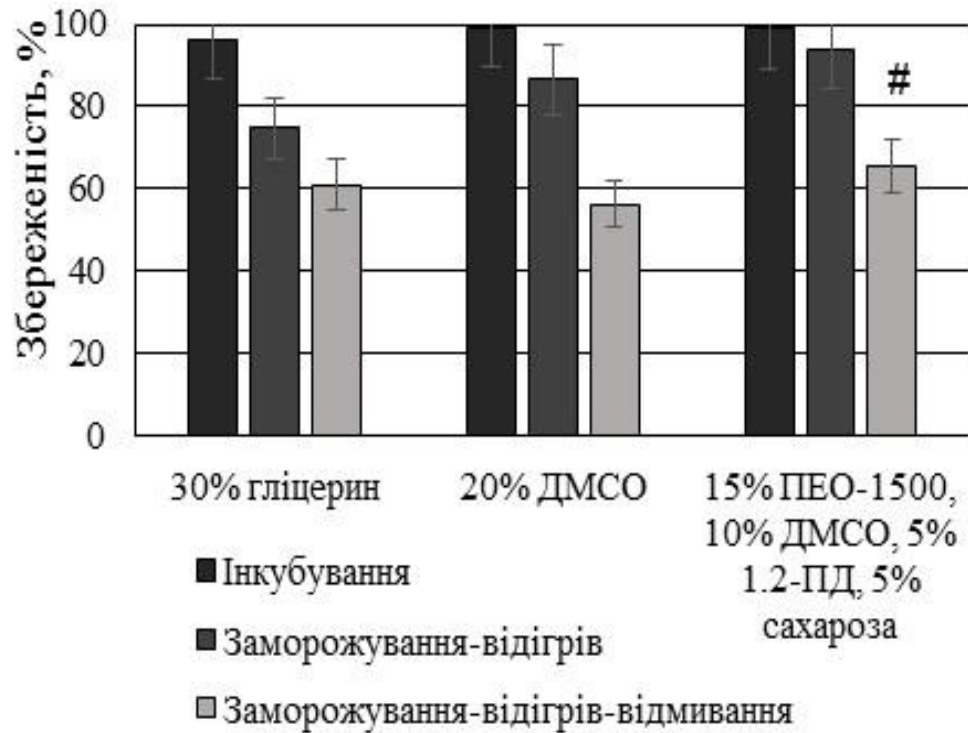


Рис. 4.2.4 Збереженість еритроцитів кролика на різних етапах кріоконсервування з однокомпонентними та комбінованими середовищами.

- статистично значущі відмінності порівняно з 20% розчином ДМСО ($p < 0,05$), $n = 6$.

З еритроцитами кролика нам не вдалося оцінити дієвість кріопротектора ПЕО-1500, оскільки при змішуванні з ним спостерігалось згортання еритроцитів. При цьому зменшення концентрації цього кріопротектору у комбінованому середовищі не призводить до згортання і дозволяє успішно консервувати еритроцити кролика. Таким чином, застосування середовищ з сумішшю екзо- та ендоцелюлярних кріопротекторів дозволяє знизити концентрацію кожного з них і, відповідно можливу токсичну дію [162]. При цьому у суспензії клітин досягається достатньо висока сумарна концентрація кріозахисних речовин як у внутрішньоклітинному, так і зовнішньоклітинному середовищі, що дає високі показники збереженості клітин при кріоконсервуванні.

Таким чином, застосування кріозахисних середовищ, що містять проникальні і непроникальні кріопротектори, дозволяє знизити концентрацію кожного з них і, відповідно, токсичну дію, але при цьому отримати досить високу сумарну концентрацію кріозахисних речовин, що дає високі показники збереженості еритроцитів при кріоконсервуванні у комбінованому захисному середовищі і дозволяє отримати максимальну кількість цілих еритроцитів досліджених ссавців як відразу після заморожування-відігріву, так і після всіх етапів кріоконсервування, включаючи відмивання від кріопротекторів. Істотно вища ефективність комбінованих кріозахисних середовищ при заморожуванні суспензій еритроцитів може бути також пов'язана з їх високою склоутворюючою здатністю, а також з тим, що їх застосування дозволяє запобігти такому фактору кріопошкодження, як кристалізація евтектичних складів (показано у розділі 3). Отже, використання комбінованого кріозахисного середовища, яке містить екзо- та ендоцелюлярні кріопротектори, може значно збільшити збереженість еритроцитів людини, бика, коня та кролика під час кріоконсервування порівняно з однокомпонентними середовищами.

За матеріалами розділу 4 опубліковано роботи [26–31, 34, 36–38, 40].

РОЗДІЛ 5 ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ НА ОСМОТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ ССАВЦІВ

5.1 Дослідження осмотичної крихкості еритроцитів ссавців на різних етапах кріоконсервування

У попередньому розділі було показано більш висока ефективність комбінованих кріозахисних середовищ, порівняно з однокомпонентними, а також підібрано багатоконпонентне середовище (15% ПЕО-1500, 10% ДМСО, 5% 1,2 -ПД, 5% сахарози), яке було більш ефективним на всіх етапах кріоконсервування еритроцитів. Але структура і функції мембран збережених після кріоконсервування клітин можуть бути порушені внаслідок дії факторів кріопошкодження. Це може призвести до швидкої загибелі еритроцитів у кровоносному руслі реципієнта після трансфузії, що призведе до ускладнення стану пацієнта.

Для оцінки стану мембран еритроцитів досліджених ссавців на різних етапах кріоконсервування була досліджена їх осмотична крихкість, за якою можна судити про механоеластичні властивості мембран еритроцитів. У першій частині цього дослідження вивчали осмотичну крихкість еритроцитів, що було кріоконсервовано під захистом 20 % розчину ДМСО (вихідна концентрація), оскільки серед однокомпонентних речовин кріопротекторів його ефективність була найвища для еритроцитів собак, коня і бика [14], але осмотичні властивості еритроцитів раніше вивчено не було. На рис. 5.1.1-5.1.3 наведено дані щодо осмотичної стійкості еритроцитів бика, коня та кролика на різних етапах кріоконсервування з ДМСО.

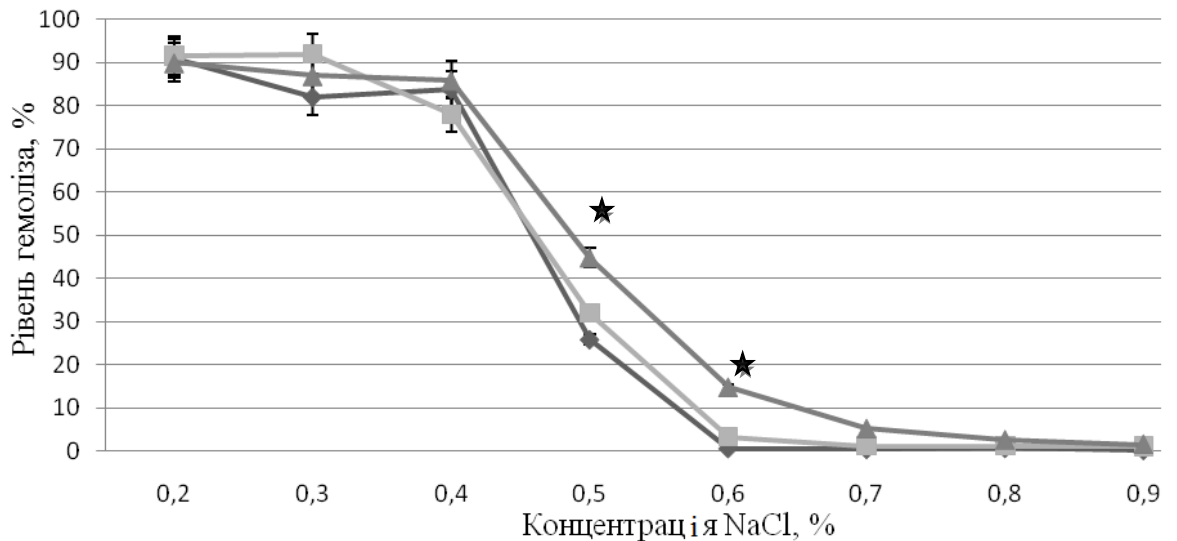


Рис. 5.1.1 Криві осмотичної крихкості еритроцитів бика: ◆ – контроль; ■ – клітини, інкубовані з ДМСО і відмиті; ▲ – клітини кріоконсервовані з ДМСО і відмиті.

* – достовірні відмінності по відношенню до контролю, $n=6$ ($p<0,05$).

Видно, що після кріоконсервування під захистом ДМСО спостерігається також збільшення осмотичної крихкості еритроцитів коня і бика, що видно з зсуву кривої лізису еритроцитів в гіпотонічних розчинах в бік збільшення концентрації NaCl. Зміни на кривих осмотичної крихкості еритроцитів кролика на всіх етапах кріоконсервування найменші, порівняно з іншими тваринами (рис. 5.1.3). Еритроцити різних видів ссавців відрізняються як складом мембран, так і внутрішньоклітинним вмістом. Так, у роботі [166] виявлена позитивна кореляція між показниками гіпертонічного шока еритроцитів ссавців і гідрофобністю їх гемоглобіна. Показано, що чим вище значення гідрофільно-гідрофобного балансу гемоглобіну еритроцитів, який відповідає більшій гідрофобності білкової молекули, тим вище рівень осмотичного пошкодження клітин у сольових розчинах. Низький рівень

гемолізу при цьому показано для еритроцитів кролика, порівняно з еритроцитами бика, коня та людини.

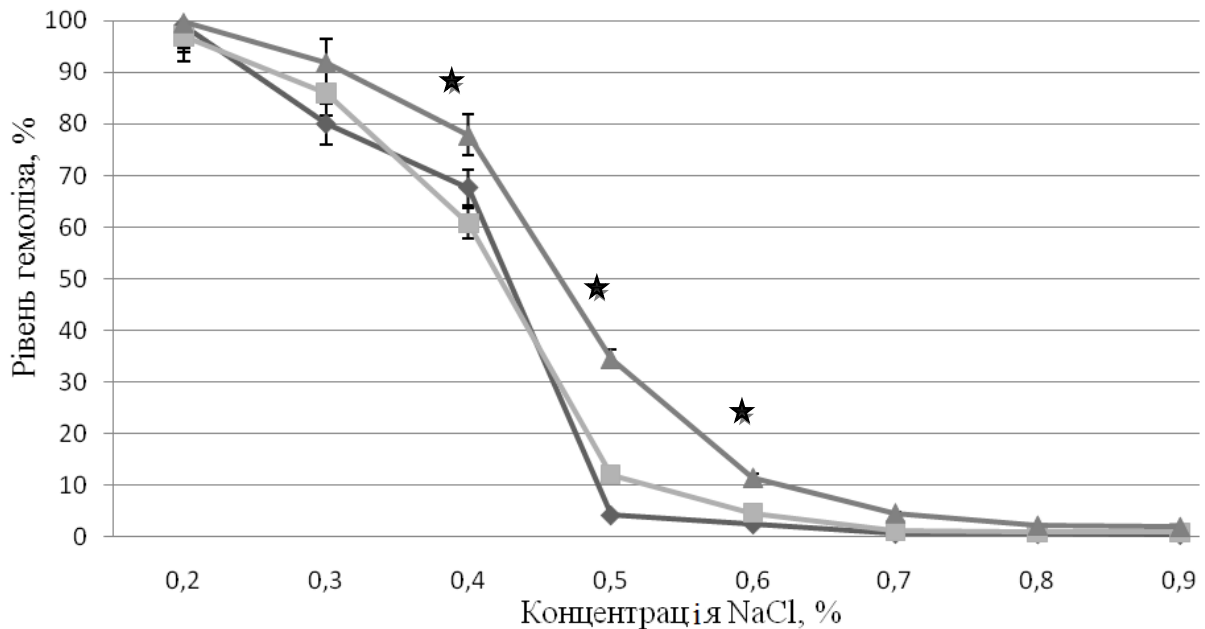


Рис. 5.1.2 Криві осмотичної крихкості еритроцитів коня: ◆ – інтактні клітини; ■ – клітини, інкубовані з ДМСО і відмиті; ▲ – клітини кріоконсервовані з ДМСО і відмиті.

* – достовірні відмінності по відношенню до інтактних клітин, $n=6$ ($p<0,05$).

На рис. 5.1.4 наведено коефіцієнт осмотичної крихкості, який визначено як концентрація NaCl, при якій відбувається 50 %-й гемоліз еритроцитів. Видно, що інкубація з ДМСО практично не впливає на коефіцієнт осмотичної крихкості еритроцитів досліджуваних тварин, але після кріоконсервування в присутності ДМСО індекс осмотической крихкості збільшується. Ймовірно, після кріоконсервування еритроцитів з 10% -м ДМСО мікров'язкість мембран знижується [15], що призводить до збільшення проникності мембран і підвищенню індексу осмотической крихкості [167].

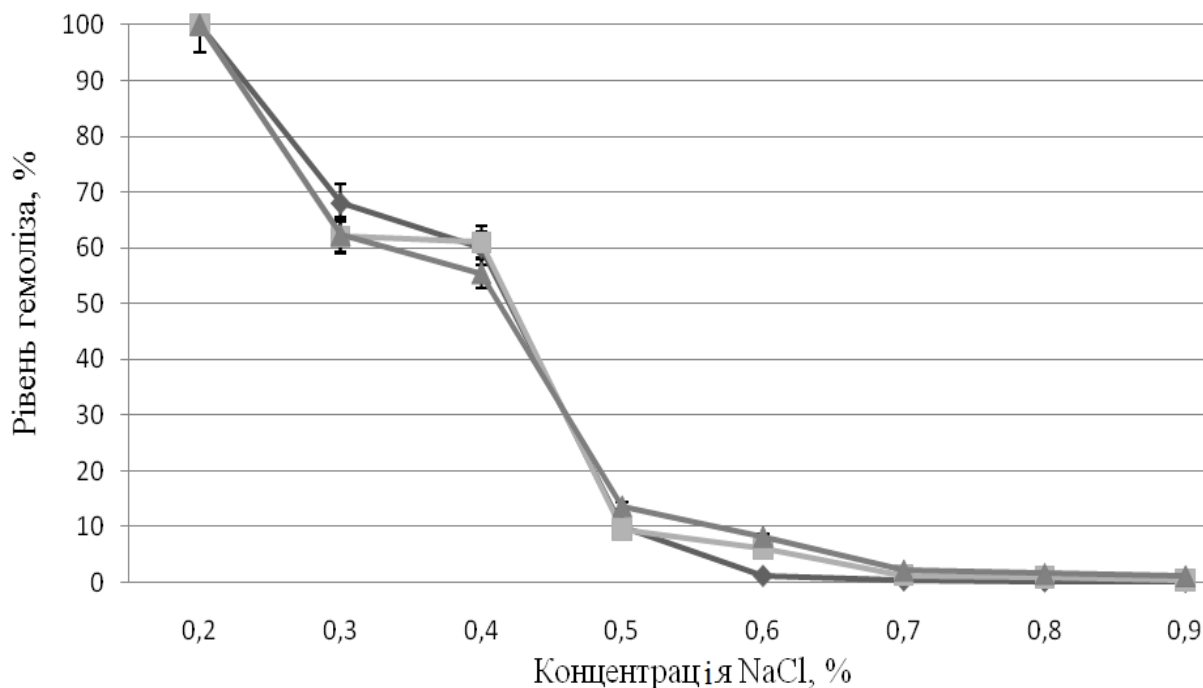


Рис. 5.1.3 Криві осмотичної крихкості еритроцитів кролика: \blacklozenge – інтактні клітини; \blacksquare – клітини, інкубовані з ДМСО і відмиті; \blacktriangle – клітини кріоконсервовані з ДМСО і відмиті.

* – достовірні відмінності по відношенню до інтактних клітин, $n=6$ ($p<0,05$).

Найменший індекс осмотичної крихкості характерний для еритроцитів кролика, що, можливо, пов'язано з їх структурними особливостями [168, 169]. Так відомо, що в мембранах еритроцитів кролика міститься більше фосфоліпідів, менше гліколіпідів і холестеролу, ніж в мембранах еритроцитів бика і коня. Можна відмітити, що індекс осмотичної крихкості еритроцитів кролика після всіх етапів кріоконсервування схожий з показниками контрольної групи, що, можливо, свідчить про їх більшу осмотичну стійкість.

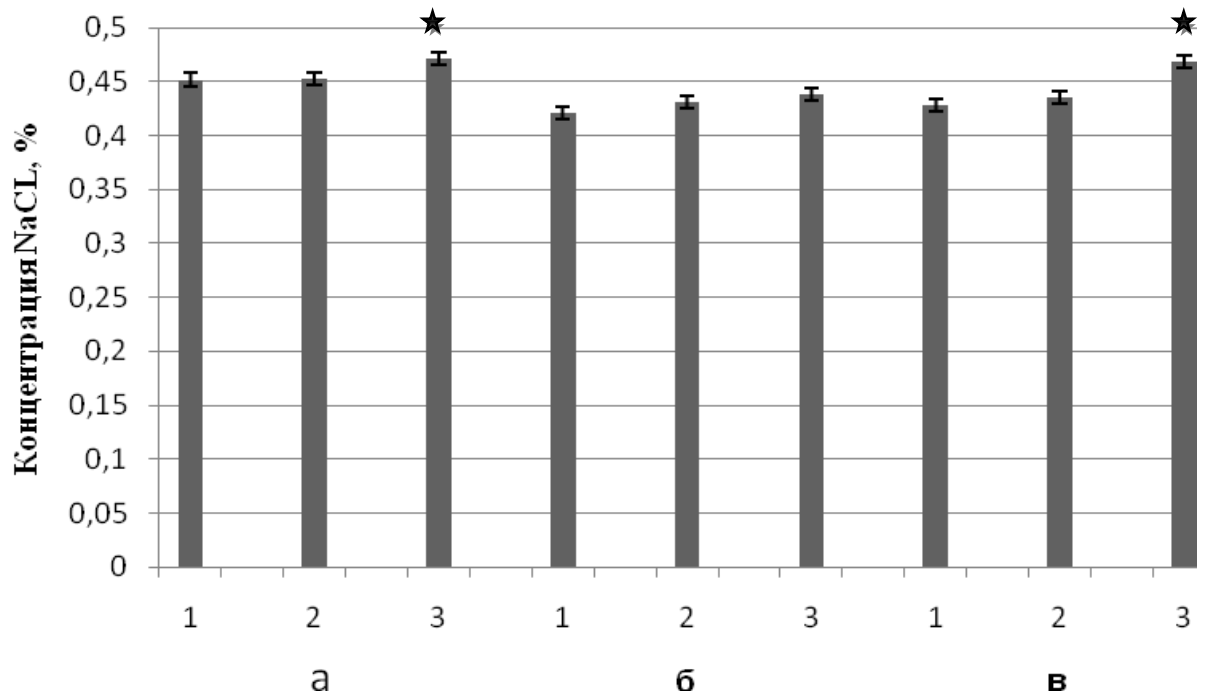


Рис. 5.1.4. Індекс осмотичної крихкості еритроцитів: а – бика, б – кролика; в – коня: 1 – інтактні клітини; 2 – клітини, інкубовані з ДМСО і відмиті; 3 – клітини, кріоконсервовані з ДМСО і відмиті. ★ – достовірні відмінності по відношенню до інтактних клітин, $n=6$ ($p<0,05$).

Знижена осмотична стійкість еритроцитів коня може бути пов'язана з рядом особливостей їх будови. Так, Betticher і Geiser виявили негативну лінійну кореляцію між розміром еритроцитів ссавців та їх стійкістю до гіпертонічного середовища [168, 170].

Таким чином, еритроцити бика, кролика і коня мають подібну осмотичну стійкість до гіпотонії. Інкубування еритроцитів досліджуваних ссавців з ДМСО істотно не впливає на їх осмотичну стійкість. Еритроцити кролика виявляють більшу стійкість до гіпотонії після кріоконсервування під захистом ДМСО в порівнянні з еритроцитами бика і коня.

На другому етапі нами було досліджено осмотичні властивості еритроцитів бика, коня та кролика на всіх етапах кріоконсервування під захистом комбінованого середовища, яке містить 15% ПЕО-1500, 10% ДМСО, 5% 1,2 -ПД, 5% сахарози.

На рис. 5.1.5 - 5.1.7 наведено криві осмотичної крихкості інтактних еритроцитів бика, кролика та коня, клітин, інкубованих в середовищі, що містить 15% ПЕО-1500, 10% ДМСО, 5% 1,2 ПД, 5% сахарози і відмитих від нього, а також кріоконсервованих в даному середовищі і відмитих.

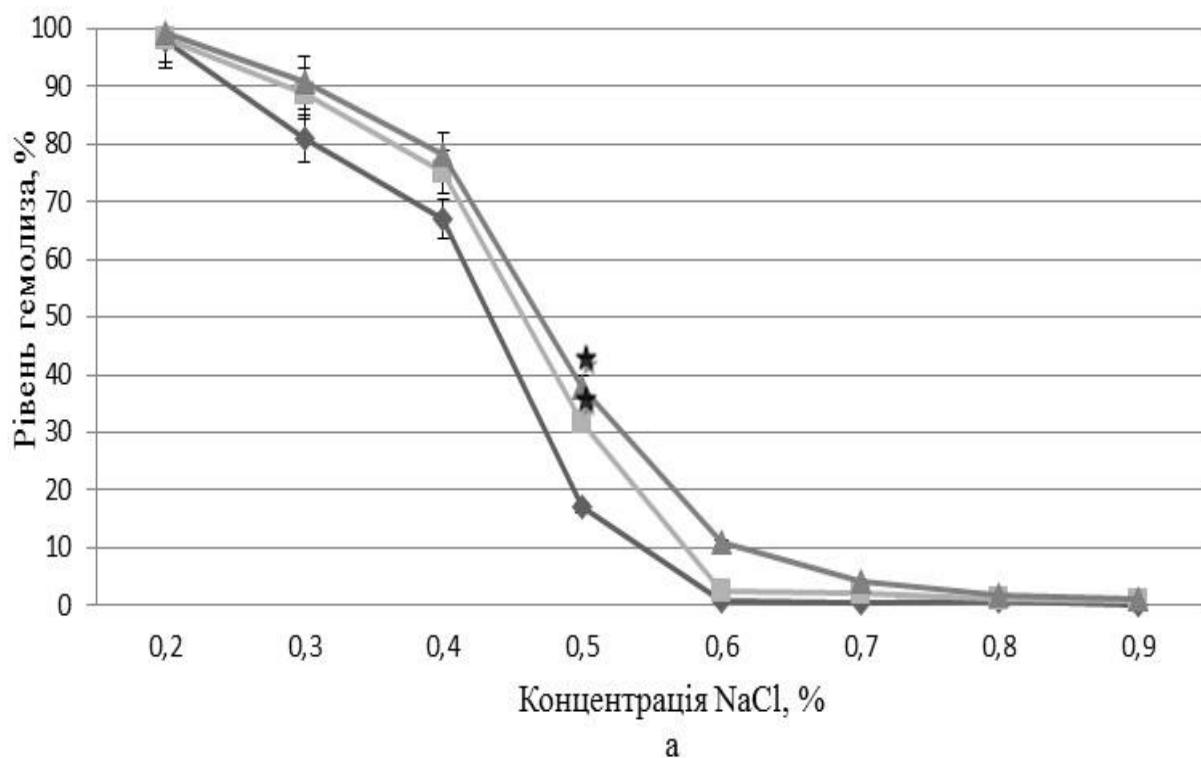


Рис. 5.1.5 Криві осмотичної крихкості еритроцитів бика:
 ◆ – інтактні клітини; ■ – клітини, інкубовані з комбінованим кріозахисним середовищем і відмиті; ▲ – клітини, кріоконсервовані з комбінованим кріозахисним середовищем і відмиті.

* – достовірні відмінності по відношенню до інтактних клітин, $n=6$ ($p<0,05$).

Видно, що осмотична крихкість еритроцитів кролика незначно змінюється при дії факторів кріоконсервування, що свідчить про їх високу осмотичну резистентність. Для еритроцитів бика спостерігається зростання осмотичної крихкості вже після інкубації їх в кріозахисного середовищі, а подальше заморожування-відігрів приводять до подальшого зміщення кривої осмотичної крихкості, але не настільки виразного. У разі еритроцитів коня виявлено незначне збільшення осмотичної крихкості на етапі інкубації з комбінованим кріозахисним середовищем і суттєве зростання цього показника після заморожування.

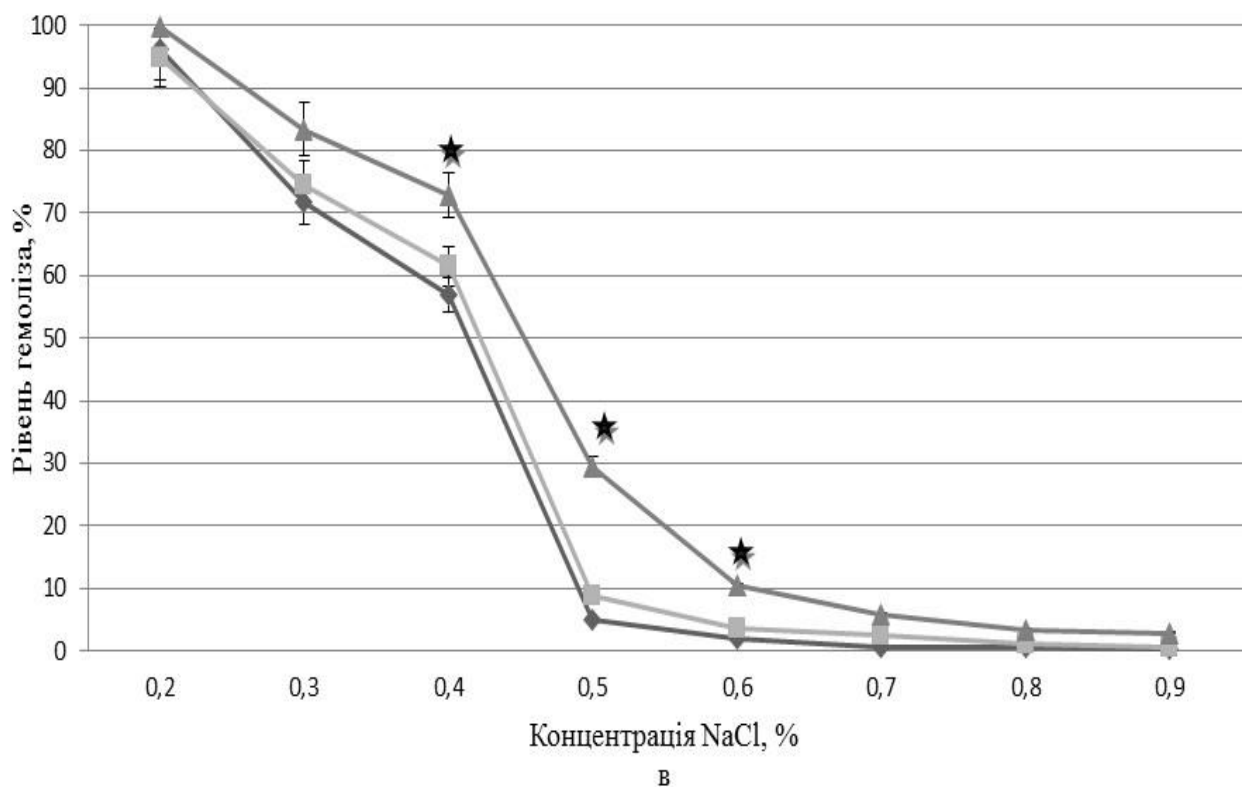


Рис. 5.1.6 Криві осмотичної крихкості еритроцитів коня: **◆** – інтактні клітини; **■** – клітини, інкубовані з комбінованим кріозахисним середовищем і відмиті; **▲** – клітини кріоконсервовані з комбінованим кріозахисним середовищем і відмиті.

* – достовірні відмінності по відношенню до інтактних клітин, $n=6$ ($p<0,05$).

Було порівняно індекс осмотичної крихкості досліджених тварин на всіх етапах кріоконсервування під захистом комбінованого кріозахисного середовища (рис. 5.1.8).

Виявлено, що індекс осмотичної крихкості еритроцитів коня у комбінованому кріозахисному середовищі, нижчий ніж у еритроцитах бика і кролика. Після впливу низьких температур цей показник зростає для всіх досліджених тварин.

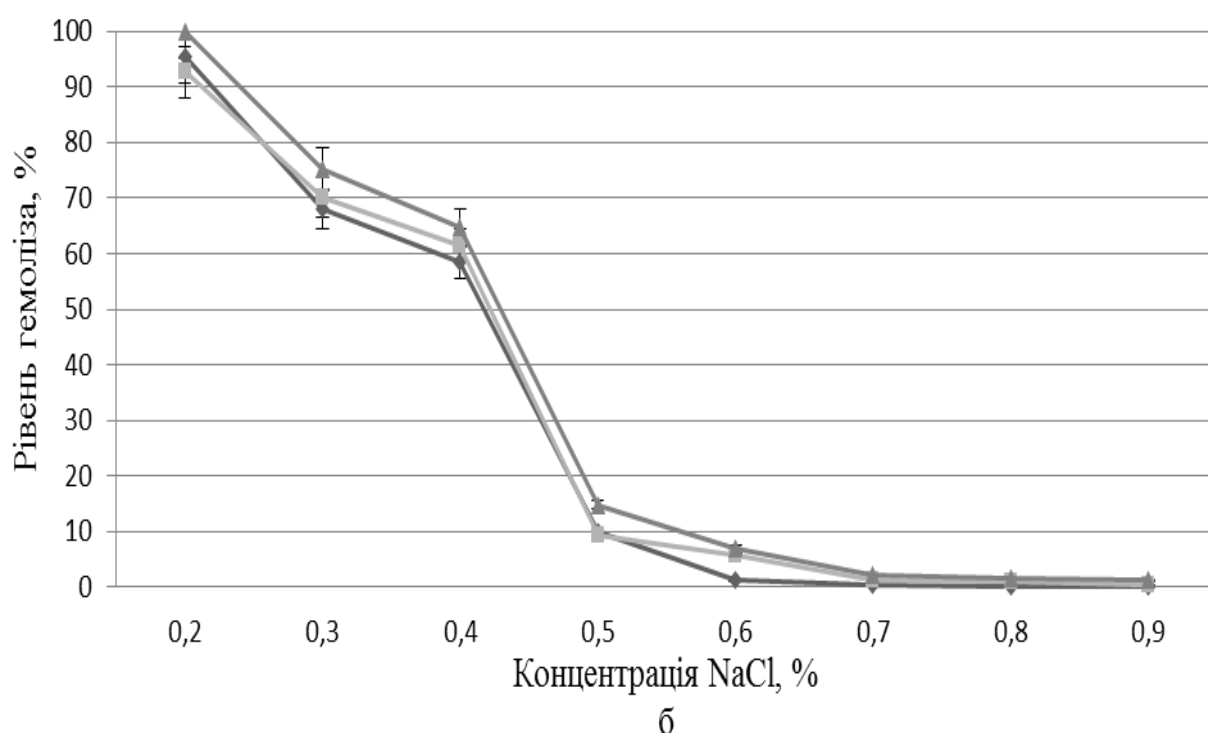


Рис. 5.1.7 Криві осмотичної крихкості еритроцитів кролика: **◆** – інтактні клітини; **■** – клітини, інкубовані з комбінованим кріозахисним середовищем і відмиті; **▲** – клітини кріоконсервовані з комбінованим кріозахисним середовищем і відмиті.

Порівнюючи ефективність однокомпонентного середовища з ДМСО і комбіноване кріозахисне середовище можна відмітити, що на етапі інкубації з кріопротектором індекс осмотичної крихкості бика, коня і кролика нижчий

у комбінованому середовищі, що свідкує про його меншу цитотоксичність. Імовірно вихідна концентрація ДМСО 20% токсично впливає на еритроцити ссавців, приводячи до змін стану їх мембран ще на етапі інкубації.

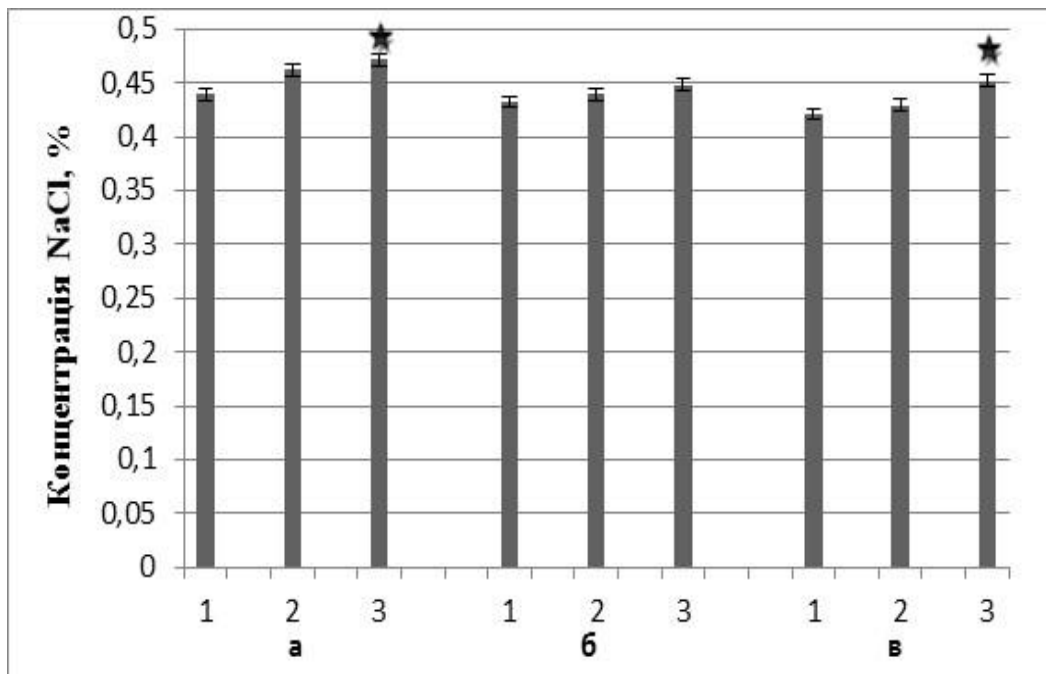


Рис. 5.1.8 Індекс осмотичної крихкості еритроцитів: а – бика, б – кролика; в – коня: 1 – інтактні клітини; 2 – клітини, інкубовані з комбінованим середовищем і відмиті; 3 – клітини кріоконсервовані з комбінованим середовищем і відмиті.

★ – достовірні відмінності по відношенню до інтактних клітин, $n=6$ ($p<0,05$).

Класичні методи заморожування клітин часто базуються на ДМСО у якості кріопротектору, його вважають одним з основних кріозахисних сполук у кріобіології протягом останніх 50 років [80, 171]. Однак використання ДМСО пов'язано із поганою поведінкою клітин після відтавання та небезпечними системними побічними ефектами [171], згідно сучасним уявленням ефективність ДМСО збалансована токсичністю, тому використовувати його треба з обережністю [80]. Тому дослідники прагнуть розробити середовища зі зменшеною концентрацією ДМСО у середовищі або

зовсім без нього [171]. Підбір кріозахисних середовищ продовжується також і для еритроцитів донорської крові для запобігання пошкоджень, які пов'язано не тільки з впливом низьких температур, але й тих, що виникають на етапі інкубації та видалення кріопротекору [152].

Таким чином, багатокомпонентне кріозахисне середовище, яке містить 15% ПЕО-1500, 10% ДМСО, 5% 1,2 -ПД, 5% сахарози дозволяє зберегти осмотичні властивості еритроцитів бика, кролика та коня у процесі кріоконсервування.

5.2 Моделювання трансфузії еритроцитів коня, бика, кролика і людини після кріоконсервування у комбінованому і однокомпонентному кріозахисному середовищі

Для попередньої оцінки можливої виживаємості у кровноносному руслі після переливання кріоконсервованих у розробленому кріозахисному середовищі еритроцитів (15% ПЕО-1500, 10% ДМСО, 5% 1,2 -ПД, 5% сахарози) було проведено моделювання їх трансфузії [140] на різних етапах (рис. 5.2.1): у контролі (рис. 5.2.1, а), після інкубування з кріоконсервуючим середовищем і відмивання (рис. 5.2.1, б) та після інкубування-заморожування-відігрівання-відмивання (рис. 5.2.1, в).

Виявлено, що після інкубування з розробленим комбінованим кріоконсервуючим середовищем, близько 97% деконсервованих еритроцитів досліджених ссавців залишаються збереженими після інкубації в плазмі і фізіологічному розчині при температурі 37 °С протягом 24 годин (рис. 5.2.1). Цей факт свідчить про відсутність цитотоксичності розробленого середовища по відношенню до еритроцитів ссавців і збереження їх осмотичних властивостей. Достовірно нижчий рівень гемолізу (2% у плазмі) зареєстровано для еритроцитів кролика, порівняно з іншими дослідженими ссавцями. Після всіх етапів кріоконсервування рівень гемолізу достовірно

зростає, порівняно з контролем, але рівень його залишається невисоким, в межах 5-6% в залежності від виду ссавців.

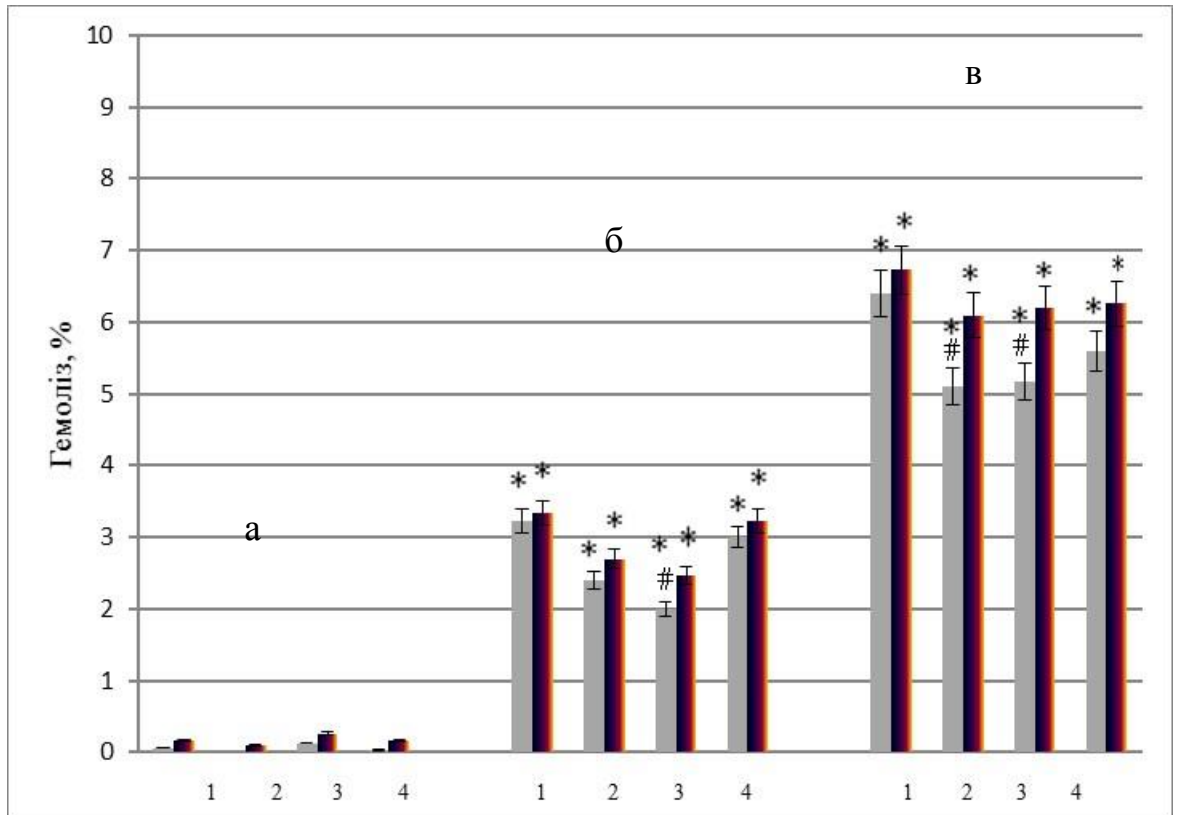


Рис. 5.2.1 Гемоліз еритроцитів ссавців при моделюванні трансфузії протягом 24 годин при 37°C у контрольній групі (а), після інкубування у комбінованому середовищі (б), після заморожування-відігрівання (в): ■ - еритроцити, які інкубовано в плазмі; ■ - еритроцити, які інкубовано в 0,9 % NaCl (pH-7,4). Еритроцити: 1 – людини; 2 – бика; 3 – кролика; 4 – коня.

* - статистично значущі відмінності порівняно з контролем; # - статистично значущі відмінності порівняно з еритроцитами інших ссавців ($p < 0,05$), $n = 6$.

Дані по моделюванню трансфузії після кріоконсервування у комбінованому середовищі було порівняно з такими у середовищі на основі ДМСО (10% кінцева концентрація) (рис. 5.2.2). Як і для комбінованого середовища, найменший гемоліз після інкубації з кріозахисним середовищем зареєстровано для еритроцитів кролика (рис.

5.2.2, б). Порівняно з комбінованим середовищем гемоліз після етапа інкубування виріс на 20-25%.

Достовірне підвищення рівня гемолізу зареєстровано також після всіх етапів кріоконсервування у середовищі на основі ДМСО порівняно з розробленим комбінованим середовищем. Це свідчить про те, що комбіноване середовище має не тільки меншу цитотоксичність, але й краще захищає мембрани від кріопошкоджень на усіх етапах кріоконсервування.

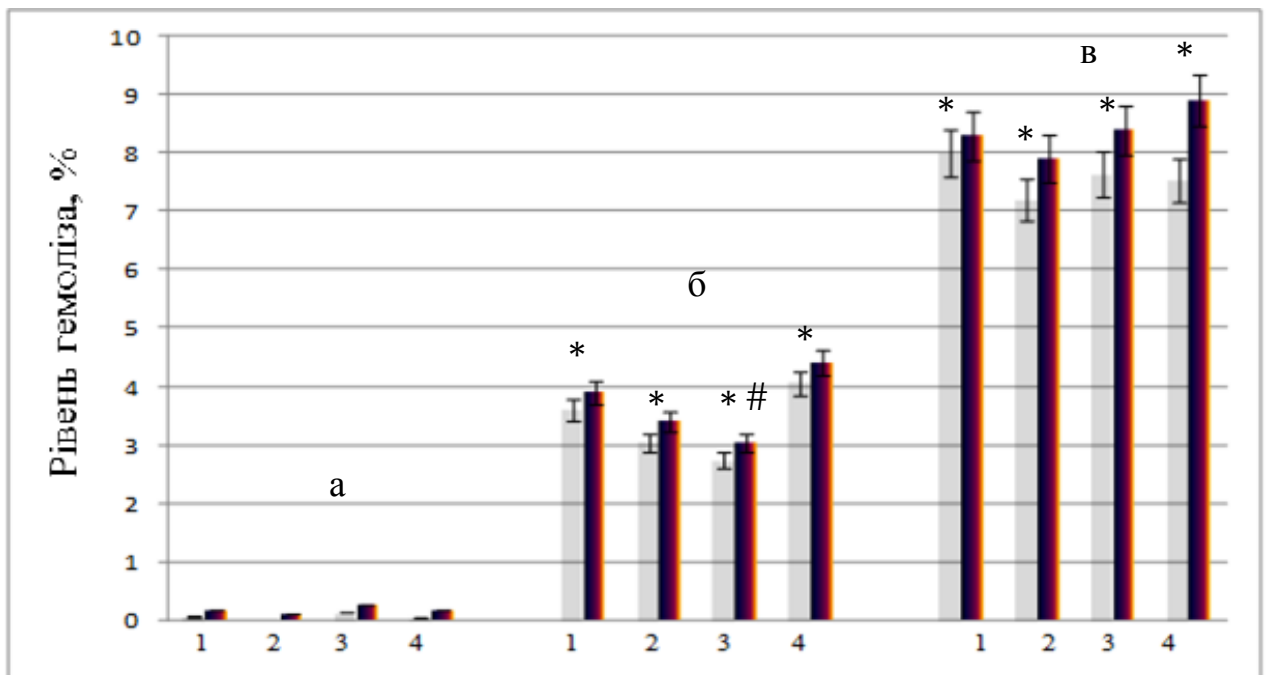


Рис. 5.2.2 Гемоліз еритроцитів ссавців при моделюванні трансфузії протягом 24 годин при 37°C у контрольній групі (а), після інкубування у 10% розчині ДМСО (б), після заморожування-відігрівання у 10% розчині ДМСО (в): ■ - еритроцити, які інкубовано в плазмі; ■ - еритроцити, які інкубовано в 0,9 % NaCl (рН-7,4). Еритроцити :1 – людини; 2 – бика; 3 – кролика; 4 – коня.

* - статистично значущі відмінності порівняно з контролем; # - статистично значущі відмінності порівняно з еритроцитами інших ссавців ($p < 0,05$), $n = 6$.

Таким чином, розроблене кріозахисне середовище (вихідна концентрація кріопротекторів: 15% ПЕО-1500, 10% ДМСО, 5% 1,2 ПД, 5% сахарози) не володіє цитотоксичністю по відношенню до еритроцитів бика, коня, кролика і людини та дозволяє покращити стан еритроцитів порівняно з однокомпонентними середовищами. Моделювання трансфузії у аутологічній плазмі протягом доби приводило до 2-3% гемолізу після етапа інкубування та 5-6% гемолізу після всіх етапів кріоконсервування еритроцитів різних ссавців у комбінованому середовищі.

За матеріалами розділу 5 опубліковано роботи [32, 33, 35, 39].

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

У даній роботі було досліджено низькотемпературні фізичні процеси у комбінованих кріозаїхисних середовищах та суспензіях еритроцитів, проведено порівняльний аналіз збереженості еритроцитів бика, коня кролика та людини на різних етапах кріоконсервування під захистом одного кріопротектору та комбінованих кріозахисних середовищ для розробки та об'грунтування універсального комбінованого середовища для кріоконсервування еритроцитів ссавців.

Фазові переходи і склування досліджували методом ДСК після швидкого охолодження (~200 град/хв) суспензій еритроцитів та розчинів кріопротекторів на етапі повільного нагріву. Показано, що кріозахисні розчини на основі ДМСО і ПЕО-1500 мають високу схильність до кристалізації евтектичних складів, на відміну від гліцерину і 1,2-ПД, для яких розвиток цього процесу не є характерним. Температура склування розчинів ДМСО достовірно нижча за температуру склування розчинів ПЕО-1500, 1,2-ПД і гліцерина. У кріозахисних розчинах ПЕО-1500 температура склування достовірно вища за інші досліджені кріопротектори. Температура склування є показником дуже важливим при розробці протоколів кріоконсервування біооб'єктів, оскільки це температура повного тверднення, нижче за якої і потрібно зберігати зразки. Аналіз впливу вивчених кріопротекторів на закономірності розвитку фазових переходів та температуру склування багатокомпонентних розчинів кріопротекторів з кріозахисними речовинами різного типу дії показав, що температура склування у комбінованому середовищі знижується при збільшенні концентрації ДМСО і підвищується при збільшенні концентрації ПЕО-1500 та при додаванні сахарози.

Виявлено, що застосування комбінованих кріозахисних середовищ дозволяє уникнути розвитку кристалізації евтектичних складів, характерних при застосуванні в складі кріозахисного середовища тільки ПЕО-1500 або

ДМСО, що дозволяє виключити один з факторів кріопошкоджень. Виявлено, що високомолекулярний кріопротектор ПЕО-1500 відіграє вирішальну роль у розвитку кристалізації евтектичних складів у комбінованих розчинах, перешкоджаючи кристалізації при температурі характерній для евтектики вода – ДМСО. Додавання сахарози у комбіновані кріоконсервуючі розчини сприяє запобіганню розвитку кристалізації евтектичних складів незалежно від співвідношення ПЕО-1500 та ДМСО у середовищі. Показано, що інтенсивність склування відрізняється для досліджених кріозахисних середовищ і залежить від сумарної концентрації кріопротекторів у середовищі, їх співвідношення та виду кріопротекторів. Можна відмітити, що визначний вплив на кількість склоподібної фази, що утворилася при охолодженні кріозахисних розчинів, має сумарна концентрація кріопротекторів у середовищі.

Показано, що у всіх досліджених кріозахисних середовищах реєструється кристалізація на етапі нагріву, тобто при швидкому охолодженні утворюється нерівноважна аморфна фаза і швидкість нагрівання має вирішальне значення для того, щоб після розсклування у переохолодженої рідині не розпочалася кристалізація. Це надзвичайно важливо для кріобіології, оскільки кристалізація при нагріві і рекристалізація можуть діяти більш згубно, ніж кристалізація на етапі охолодження.

В роботі визначені температури фазових переходів і склування в суспензіях еритроцитів ссавців з широко вживаними в кріобіології кріопротекторами: гліцерином, 1,2-ПД, ДМСО і ПЕО-1500, та порівняно їх з фазовими переходами у суспензіях еритроцитів ссавців з комбінованими кріозахисними середовищами. Виявлено, що температура склування еритроцитів у комбінованих кріозахисних середовищах, які містять ПЕО-1500, ДМСО, 1,2-ПД і сахарозу підвищується в порівнянні з температурою склування середовищ на основі ДМСО, що дозволяє підвищити рекомендовану температуру зберігання еритроцитів ссавців в цих середовищах. Температура зберігання еритроцитів коня, бика і кролика в

середовищах, які містять ПЕО-1500, ДМСО, 1,2-ПД і сахарозу повинна бути нижча за $-95\text{ }^{\circ}\text{C}$, що достовірно вище температури рекомендованої температури зберігання при використанні однокомпонентного розчину ДМСО (нижче $-125\text{ }^{\circ}\text{C}$). Тому комбіновані кріозахисні середовища є більш придатними для практичного використання і дозволяють розширити варіанти використаного обладнання та діапазон можливих коливань температури без нарощування пошкоджень клітин.

Встановлено, що флуоресцентний барвник 3-DAB ефективно забарвлює мембрани еритроцитів коня, бика і кролика. При дії пошкоджуючих факторів кріоконсервування мембрани частини еритроцитів набувають більш пухку структуру і кількість гідрофобних місць зв'язування зонда збільшується, що призводить до збільшення флуоресценції клітин з пошкодженими мембранами. Це робить можливим успішно застосовувати флуоресцентний барвник 3-DAB у проточно-цитофлуориметричному аналізі та флуоресцентній мікроскопії для оцінки стану еритроцитів тварин після кріоконсервування. Однокомпонентне кріозахисне середовище на основі ДМСО недостатньо ефективно при кріоконсервуванні еритроцитів коня і більшість клітин, які збереглися після заморожування не відновлюють свої морфологічні характеристики. При консервуванні еритроцитів коня і бика у комбінованому кріозахисному середовищі не тільки знижуються загальні втрати клітин у порівнянні з розчином ДМСО, але й також еритроцити, які збереглися після всіх етапів кріоконсервування більш близькі до контрольних. Це особливо актуально для еритроцитів коня, які більш чутливі до пошкоджуючи кріобіологічних факторів.

Вивчення впливу компонентів комбінованого кріозахисного середовища на збереженість еритроцитів ссавців показало, що незначна добавка в комбіноване середовище сахарози дозволяє істотно зменшити гемоліз еритроцитів при заморожуванні. Використання ДМСО при концентрації в суспензії вище 5% призводить до достовірного підвищення рівня гемолізу ще на етапі інкубації. Підвищення концентрації ПЕО-1500

дозволяє істотно знизити рівень гемолізу еритроцитів на етапі заморожування - відігріву. Однак спостерігається різке зростання рівня гемолізу на етапі видалення кріопротектору. З еритроцитами кролика неможливо оцінити дієвість кріопротектора ПЕО-1500, оскільки при змішуванні з ним спостерігається згортання еритроцитів. При цьому зменшення концентрації цього кріопротектору у комбінованому середовищі не призводить до згортання і дозволяє успішно консервувати еритроцити кролика.

Показано, що після заморожування в комбінованому середовищі (15% ПЕО-1500 + 10% ДМСО + 5% 1,2-ПД + 5% сахарози) гемоліз еритроцитів бика становить складає 5,2%, кролика - 6,4%, коня - 7,2%, а людини - 5,9 %. Після всіх етапів кріоконсервування (інкубації з кріозахисним середовищем, заморожування-відігрівання, процедури видалення кріопротекторів і перенесення в ізотонічне середовище) рівень гемолізу еритроцитів суттєво зростає, але вдається отримати від 74,6 % до 81,6% збережених клітин, залежно від виду ссавців.

Найменший індекс осмотичної крихкості характерен для еритроцитів кролика, що, можливо, пов'язано з їх структурними особливостями, так як відомо, що в мембранах еритроцитів кролика міститься більше фосфоліпідів, менше гліколіпідів і холестеролу, ніж в мембранах еритроцитів бика і коня. Можна відмітити, що індекс осмотичної крихкості еритроцитів кролика після всіх етапів кріоконсервування схожий з показниками контрольної групи, що, можливо, свідчить про їх більшу осмотичну стійкість. Порівнюючи ефективність однокомпонентного середовища з ДМСО і комбінованого кріозахисного середовища можна відмітити, що на етапі інкубації з кріопротектором індекс осмотичної крихкості бика, коня і кролика нижчий у комбінованому середовищі, що свідкує про його меншу цитотоксичність. Імовірно вихідна концентрація ДМСО 20% токсично впливає на еритроцити ссавців, приводячи до змін стану їх мембран ще на етапі інкубації. Після заморожування-відігріву еритроцитів бика різниця між індексами осмотичної

крихкості клітин з ДМСО і комбінованим середовищем нівелюється. З еритроцитами кролика і коня індекс осмотичної крихкості еритроцитів з комбінованим середовищем на всіх етапах кріоконсервування достовірно нижчий, ніж з однокомпонентним середовищем на основі ДМСО.

Моделювання трансфузії еритроцитів ссавців після інкубування з комбінованим кріоконсервуючим середовищем показало, що як інкубація з кріозахисним середовищем, так і подальші заморожування-відігрівання впливають на стан еритроцитів і їх гемоліз протягом 24 годин при 37 °С достовірно збільшується. Але навіть після всіх етапів кріоконсервування близько 94% деконсервованих еритроцитів досліджених ссавців залишаються збереженими при моделюванні умов трансфузії як у плазмі, так і фізіологічному розчині. Кількість еритроцитів загиблих при моделюванні трансфузії протягом 24 годин після інкубації з ДМСО і після всіх етапів кріоконсервування з ним достовірно більша, ніж з комбінованим кріозахисним середовищем. Таким чином, багатоконпонентне кріозахисне середовище, яке містить 15% ПЕО-1500, 10% ДМСО, 5% 1,2 -ПД, 5% сахарози дозволяє зберегти осмотичні властивості еритроцитів бика, кролика та коня у процесі кріоконсервування, що може підвищити рівень післятрансфузійного приживання еритроцитів та подовжити тривалість циркуляції еритроцитів після переливання.

Таким чином, застосування кріозахисних середовищ, що містять проникальні і непроникальні кріопротектори, дозволяє знизити концентрацію кожного з них і, відповідно, токсичну дію, але при цьому отримати досить високу сумарну концентрацію кріозахисних речовин, що дає високі показники збереженості еритроцитів при кріоконсервуванні у комбінованому захисному середовищі і дозволяє отримати максимальну кількість цілих еритроцитів досліджених ссавців як відразу після заморожування-відігріву, так і після всіх етапів кріоконсервування, включаючи відмивання від кріопротекторів. Істотно вища ефективність комбінованих кріозахисних середовищ при заморожуванні суспензій еритроцитів може бути також

пов'язана з їх високою склоутворюючою здатністю, а таких з тим, що їх застосування дозволяє запобігти такому фактору кріпошкодження, як кристалізація евтектичних складів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлені теоретичне та експериментальне узагальнення впливу компонентів комбінованого кріозахисного середовища на фазовий стан рідини у суспензіях клітин при низьких температурах та збереженість еритроцитів бика, коня, кролика та людини на всіх етапах кріоконсервування, та нове рішення наукового завдання, направлено на розробку універсального комбінованого середовища для успішного низькотемпературного зберігання еритроцитів ссавців. Дослідження, проведені у дисертаційній роботі, доводять важливість використання у кріозахисному розчині кріопротекторів різного типу дії для отримання високих показників збереженості еритроцитів. Такий підхід дозволяє досягти достатньої концентрації кріопротекторів як у внутрішньоклітинному середовищі, так і зовні клітин для запобігання пошкоджуючої дії кристалів льоду, концентрація кожного кріопротектору при цьому нижча за токсичний для клітин рівень.

1. Досліджені низькотемпературні фазові переходи і процеси склування у комбінованих середовищах, які містять проникальні (гліцерин, 1,2-ПД, ДМСО) і непроникальні (ПЕО-1500, сахароза) кріопротектори. Виявлено, що підвищення концентрації ДМСО у комбінованому середовищі приводить до зниження температури склування, а ПЕО-1500 – до її підвищення. Кількість склоподібної фази, що утворюється при охолодженні комбінованих кріозахисних розчинів пропорційна сумарній концентрації кріопротекторів.

2. Встановлено, що застосування комбінованих кріозахисних середовищ дозволяє запобігти розвитку кристалізації евтектичних складів, яка характерна для розчинів ПЕО-1500 або ДМСО, та виключає один із можливих факторів кріопошкодження при кріоконсервуванні еритроцитів.

3. Визначені температури фазових переходів і склування в суспензіях еритроцитів ссавців з гліцерином, 1,2-ПД, ДМСО і ПЕО-1500.

Показано, що в присутності ПЕО-1500 температура склування в суспензії клітин на 25 ÷ 30 град. вища, ніж при використанні гліцерину і 1,2-ПД, та на 50-55 град. вища, ніж з ДМСО.

4. Температура склування при кріоконсервуванні еритроцитів у комбінованому кріозахисному середовищі, яке містить ПЕО-1500, ДМСО, 1,2-ПД и сахарозу достовірно підвищується у порівнянні з температурою склування у однокомпонентних середовищах із ДМСО, 1,2-ПД або гліцерином, що дозволяє розширити діапазон можливих температур зберігання еритроцитів ссавців і робить середовище зручнішим для практичного застосування. Рекомендована температура зберігання у розробленому комбінованому середовищі нижче -95 °С, а при використанні однокомпонентного розчину ДМСО нижче -125 °С.

5. Встановлено, що збереженість еритроцитів бика, коня, кролика і людини вища при кріоконсервуванні з комбінованими кріозахисними середовищами, ніж з кріопротектором одного типу дії. Еритроцити коня більш чутливі до пошкоджуючої дії факторів кріоконсервування, ніж еритроцити бика, кролика і людини.

6. Показано, що після кріоконсервування у комбінованому кріозахисному середовищі осмотичні властивості деконсервованих еритроцитів ссавців кращі і при моделюванні трансфузії гемоліз їх нижче, ніж після кріоконсервування в однокомпонентному середовищі. Близько 94-95 % деконсервованих еритроцитів досліджених ссавців залишаються збереженими при моделюванні трансфузії протягом 24 годин.

7. Розроблено і запатентовано середовище, яке містить 15% ПЕО-1500, 10% ДМСО, 5% 1,2 ПД і 5% сахарози, яке ефективно захищає еритроцити бика, коня, кролика і людини на всіх етапах кріоконсервування. Після 15 хвилин інкубації з розробленим середовищем гемоліз не перевищує 1%, після заморожування-відігрівання 5-7%, після всіх етапів кріоконсервування 18-25% в залежності від виду ссавців.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Proverbio D, Lubas G, Spada E et al. Prevalence of Dal blood type and dog erythrocyte antigens (DEA) 1, 4, and 7 in canine blood donors in Italy and Spain. *BMC Vet Res* [Internet]. 2020 May 6 [cited 2020 Oct 1]; 16(126). Available from: <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02351-1>
2. Le Gal A, Thomas EK, Humm KR. Xenotransfusion of canine blood to cats: a review of 49 cases and their outcome. *Journal of Small Animal Practice*. 2020. 61(3):145–208.
3. Martinez-Sogues L, Blois SL, Manzanilla EG, Abrams-Ogg AO, Cosentino P. Exploration of risk factors for non-survival and for transfusion-associated complications in cats receiving red cell transfusions: 450 cases (2009 to 2017). *Journal of Small Animal Practice*. 2020; 61(3):177–184.
4. Kumar R. Blood transfusion in veterinary medicine. *Hematol Transfus Int J*. 2017; 4(4):116–22.
5. Sink C. Practical transfusion medicine for the small animal practitioner, 2nd edition. Wiley-Blackwell; 2017 March; 96 p.
6. Webb G. Canine and feline blood transfusions. *The Veterinary Nurse*. 2019 Feb; 10(3):139–45.
7. Mair T, Divers T. *Equine Internal Medicine*. Oakville: CRC Press; 2015. 299 p.
8. Mudge MC. Acute hemorrhage and blood transfusions in horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 2014; 30(2):427–36.
9. Saritha G, Haritha GS, Kumari KN, Sundar NS. Blood transfusion in a calf with life-threatening anemia. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*. 2016 May; 9(5):69-70.
10. Yagi K, Holowaychuk M. *Manual of Veterinary Transfusion Medicine and Blood Banking*. Wiley-Blackwell; 2016. 408 p.
11. Keeble E, Meredith A, Richardson J, editors *Rabbit medicine and surgery*. Boca Raton: CRC Press; 2016. 259 p.

12. Wilder A, Humm K. Pet owners' awareness of animal blood banks and their motivations towards animal blood donation. *Veterinary Record*. 2019; 185(16):509.

13. Pogozhykh D, Pakhomova Y, Pervushina O, Hofmann N, Glasmacher B, Zhegunov G. Exploring the possibility of cryopreservation of feline and canine erythrocytes by rapid freezing with penetrating and non-penetrating cryoprotectants. *PloS One* [Internet]. 2017 Jan 10 [cited 2020 Oct 1]; 12(1):e0169689. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28072844/>.

14. Денисова ОН, Жегунов ГФ, Бабийчук ЛА. Криоконсервирование эритроцитов животных под защитой диметилсульфоксида, полиэтиленоксида, глицерина. *Проблемы криобиологии*. 2005; 15(2):195–201.

15. Денисова ОН. Криочувствительность эритроцитов различных видов млекопитающих. автореф. дисс. на соискание ученой степени канд. биол. наук. Харьков; 2006. 20 с.

16. Пахомова ЮС, Чеканова ВВ, Компаниец АМ. Криозащитные свойства растворов на основе непроникающего ОЭГn=25 в комбинации с проникающими криопротекторами при замораживании эритроцитов человека *Проблемы криобиологии и криомедицины*. 2013; 23(1):26–39.

17. Ромазанов ВВ, Бонадренко ВА. Осмотические свойства эритроцитов, замороженных в средах с непроникающими и проникающими криопротекторами. *Проблемы криобиологии*. 2010; 20(1):47–58.

18. Ромазанов ВВ, Бонадренко ВА. Проявление и устранение "упаковки" в средах с непроникающими и проникающими криопротекторами. *Проблемы криобиологии*. 2009; 19(3):312–323.

19. Hvozdiuk YV, Chekanova VV, Pakhomova YS, Kompaniets AM. Physicochemical properties and cryoprotective action of solutions of polyvinyl alcohol, glycerol and media based on their combinations during freezing of red blood cells. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2020; 30(3):288.

20. Жегунов ГФ, Нардид ОА, Стегний БТ. Основы криобиологии и криомедицины.; Жегунов ГФ, Нардид ОА, редакторы. Харьков: Бровин АВ; 2019. 614 с.
21. Петрушко МП. Сучасний стан проблеми кріоконсервування репродуктивних клітин та ембріонів людини. Вісн. НАН України. 2017; 7:44–53.
22. Зинченко АВ, Боброва ЕН, Говорова ЮС, Розанова ЕД, Карпенко ВГ. Влияние низкотемпературного хранения плаценты человека на фазовые переходы во фракциях экстрактов плаценты и в смесях фракций с клетками Проблемы криобиологии и криомедицины. 2015; 25(2):122–130.
23. Улизко ПЮ, Боброва ЕН, Зинченко АВ, Жегунов ГФ. Фазовые переходы и стеклование в криозащитных средах и суспензиях эритроцитов лошади ниже 0°C. Вісник проблем біології і медицини. 2011;2(3):253-6.
24. Ulyzko PYu, Bobrova OM, Vodopyanova LA. Influence of Low-Temperature Phase Transitions on Erythrocytes Integrity. ProblCryobiolCryomed. 2019;29(2):179.
25. Улізко ПЮ, Боброва ОМ. Низькотемпературні фазові переходи під час кріоконсервування еритроцитів коня з використанням комбінованих кріозахисних середовищ. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2017;27(2):178.
26. Kovalenko IF, Ulyzko PY, Bobrova OM, Nardid OA, Zubov PM, Novorova YS. Evaluation of efficiency of equine erythrocytes cryopreservation using fluorescent dyes. Альманах науки. 2018; 4(13):14–7.
27. Ulyzko PYu, Bobrova OM, Vodopyanova LA. Application of fluorescent dyes to assess the state of bovine and equine erythrocytes after cryopreservation. Probl Cryobiol Cryomed. 2018;28(2):189.
28. Ulyzko PYu, Bobrova OM, Nardid OA, Zubov PM, Kovalenko IF, Kuchkov VM, Vodopianova LA. Cryopreservation of equine and bovine erythrocytes using combined protective media. ProblCryobiolCryomed. 2019;29(3):255-65.

29. Ulizko P, Bobrova O, Nardid E, Goriacha I, Schetinsky M. Cryopreservation of animals' erythrocytes. In: Proceedings of the International Academic Congress «European Research Area: Status, Problems and Prospects». Riga; 2016. p. 13–5.
30. Ulizko P, Bobrova O, Nardid O, Vodopyanova L, Repina S. New cryoprotective media for cryopreservation of mammal mammal erythrocytes. *Trakia Journal of Sciences*. 2019; 4:303–7.
31. Улизко ПЮ, Жегунов ГФ, Боброва ЕН, Зинченко АВ. Влияние смесей криопротекторов на сохранность криоконсервированных эритроцитов млекопитающих. *Вісник проблем біології і медицини*. 2011;3(3):23-9.
32. Улизко ПЮ, Жегунов ГФ, Денисова ОН. Влияние криоконсервирования с ДМСО на сохранность и осмотическую хрупкость эритроцитов различных видов млекопитающих. *Проблемы криобиологии*. 2011;21(1):52-7.
33. Улизко ПЮ, Боброва ЕН, Жегунов ГФ. Осмотические свойства эритроцитов млекопитающих, криоконсервированных в присутствии комбинированных криозащитных сред. *Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук*. 2014;6(1):100-7.
34. Улизко ПЮ, Боброва ЕН, Кучков ВН, Водопьянова ЛА, Говорова ЮС. Современные методы долгосрочного хранения эритроцитов сельскохозяйственных животных. *Актуальные проблемы зоологической науки в Беларуси. Сборник статей XI Зоологической Международной научно-практической конференции*; 2017. Беларусь, Минск: А.Н. Вараксин; 1:393-7.
35. Ulizko P, Bobrova O, Vodopyanova L, Mangasarov D. Complex cryopreservation medium for mammalian erythrocytes. *Cryo 2020. The 57th annual meeting of the Society for cryobiology. Abstracts*; 2020 July 21 23; Virtual annual meeting; 2020, p.65.

36. Говорова ЮС, Зінченко ОВ, Боброва ОМ, Нардід ОА, Рєпіна СВ, Улізко ПЮ. Вплив 1,2-пропандіолу на конформаційну стабільність гемоглобіну бика і коня. Біологія тварин. 2018; 20(3):105.

37. Улизко ПЮ, Боброва ЕН, Нардид ОА, Водопьянова ЛА, Кучков ВН. Применение комбинированной криозащитной среды при криоконсервировании эритроцитов человека, быка, коня и кролика. Стратегії інноваційного розвитку природничих дисциплін: досвід, проблеми та перспективи; 2019; Кропивницький, 141-2.

38. Житняковська ОА, Улизко ПЮ, Соколик ОА, Дюбко ТС, Жегунов ГФ. Дослідження кріочутливості еритроцитів тварин в умовах низькотемпературного консервування із застосуванням флуоресцентних методів. Збірник тез VI Міжнар. наук. конфер. Молодь і поступ біології; 2010; Львів, с.9.

39. Улизко ПЮ, Боброва ЕН, Жегунов ГФ, Зинченко АВ. Применение комбинированных криозащитных сред при криоконсервировании эритроцитов млекопитающих. Биология – наука XXI века. 17-я Международная Пущинская школа- конференция молодых ученых. Сборник тезисов. 2013 апр. 21-26; Пущино; 2013, с. 157-8.

40. Улізко ПЮ, Боброва ОМ. Вплив кріопротекторів і низьких температур на збереженість еритроцитів бика, коня та кролика. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2016; 26(2):184.

41. Hunt CJ. Cryopreservation: vitrification and controlled rate cooling. Stem Cell Banking. 2017; 1590:41–77.

42. Meneghel J, Kilbride P, Morris JG, Fonseca F. Physical events occurring during the cryopreservation of immortalized human T cells. PLoS One [Internet]. 2019 May 23 [cited 2020 Oct 3]; 14(5):e0217304. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31120989/>

43. Todrin AF, Timofeyeva OV, Smolyaninova YeI, Popivnenko LI, Gordienko OI. Physical-mathematical model of substance redistribution between

the cell and its hypertonic solution environment of penetrating cryoprotectants with relevance to membrane potential. *Cryoletters*. 2020; 41(4):209–15(7).

44. Yang J, Gao L, Liu M et al. Advanced biotechnology for cell cryopreservation. *Trans. Tianjin Univ.* 2019; 26:409–23.

45. Miyamoto Y, Ikeuchi M, Noguchi H, Hayashi S. Long-term cryopreservation of human and other mammalian cells at 80 C for 8 years. *Cell Medicine*. 2018; 10:1–7.

46. Anderson DM, Benson JD, Kearsley AJ. Foundations of modeling in cryobiology—III: Inward solidification of a ternary solution towards a permeable spherical cell in the dilute limit. *Cryobiology*. 2020 Febr; 92:34–46.

47. Anderson DM, Benson J, Kearsley AJ. Foundations of modeling in cryobiology—II: Heat and mass transport in bulk and at cell membrane and ice-liquid interfaces. *Cryobiology*. 2019 Dec; 91:3–17.

48. Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol*. 2015; 1257:3-19.

49. Zhmakin AI. Fundamentals of Cryobiology. Physical Phenomena and Mathematical Models. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2009. 278 p.

50. Guo J-H, Weng CF. Current status and prospects of cryopreservation in aquatic crustaceans and other invertebrates. *Journal of Crustacean Biology*. 2020 Jul; 40(6): 343–50.

51. Meryman HT. Freezing and Vitrification of red cells, recollections and predictions. In: Sibinga CTS, Cash JD, editors. *Transfusion Medicine: Quo Vadis? What Has Been Achieved, What Is to Be Expected*. Developments in Hematology and Immunology. Boston: Springer; 2001. 36: 69–85.

52. Fonseca F, Meneghel J, Cenard S, Passot S, Morris GJ. Determination of Intracellular Vitrification Temperatures for Unicellular Micro Organisms under Conditions Relevant for Cryopreservation. *PLoS One* [Internet]. 2016 Apr 7. [cited 2020 Oct 15]; 11(4):e0152939. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27055246/>

53. Макашова ОЄ, Бабійчук ЛО, Зубова ОЛ, Зубов ПМ. Вплив різних концентрацій кріопротектора ДМСО на збереженість, життєздатність та вміст активних форм кисню в ядровмісних клітинах кордової крові при кріоконсервуванні. Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. 2016; 26:157–64.
54. Жмакин АИ. Физические основы криобиологии. Успехи физических наук. 2008; 178(3):243–66.
55. Franks F, Mathias SF, Galfre P et al Ice nucleation and freezing in undercooled cells. *Cryobiology*. 1983; 20:298–309.
56. Acker JP, Elliot JAW, McGann LE. Intracellular ice propagation: experimental evidence for ice growth through membrane pores. *Biophys J*. 2001; 81:1389–97.
57. Mazur P. Principles of cryobiology In: Fuller BJ, Lane N, Benson EE, editors. *Life in the frozen state*. Boca Raton: CRC Press; 2004. p. 3–65.
58. Farrent J, Morris GJ. Thermal shock and dilution shock as the causes of freezing injury. *Cryobiology*. 1973; 10:134–40.
59. Levitt J A sulfhydryl-disulphide hypothesis of frost injury and resistance in plants. *J Theor Biol*. 1962; 3:355–91.
60. Muldrew K, Acker JP, Elliot JAW, McGann LE The water to ice transition: implications for living cells. In: Fuller BJ, Lane N, Benson EE, editors. *Life in the frozen state*. Boca Raton: CRC Press; 2004. P. 67–108.
61. Toner M, Cravalho EG, Karel M. Thermodynamics and kinetics of intracellular ice formation during freezing of biological cells. *J Appl Phys*. 1990; 67:1582–93.
62. Farrent J, Walter CA, Lee H, McGann LE Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing. *Cryobiology*. 1977; 14:273–86.
63. Steponkus PL, Dowgert MF. Gas bubble formation during intracellular ice formation. *Cryo-Letters*. 1981; 2:42–7.

64. Shimada K, Asahina E. Visualization of intracellular ice crystals formed in rapidly frozen cells at -27°C . *Cryobiology*. 1975; 12:209–18.
65. Bischof JC, Rubinsky B. Large ice crystals in the nucleus of rapidly frozen liver cells. *Cryobiology*. 1993 Dec; 30(6):597–603.
66. Gordiyenko OI, Kovalenko SYe, Kovalenko IF, Ogurtsova VV, Todrin AF. Theoretical estimation of the optimum cooling rate of a cell suspension at linear freezing modes based on a two factor theory of cryodamage. *CryoLetters*. 2018; 39(6):380–5.
67. Mazur P. Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *Am J Physiol*. 1973; 247:C125–C147.
68. Karlsson JOM, Cravalho EG, Toner M. Intracellular ice formation: causes and consequences. *Cryo-Letters*. 1993; 14:323–34.
69. Mazur P, Seki S. Survival of mouse oocytes after being cooled in a vitrification solution to -196°C at 95° to $70,000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and warmed at 610° to $118,000^{\circ}\text{C}/\text{min}$: A new paradigm for cryopreservation by vitrification. *Cryobiology*. 2011 Feb; 62(1):1–7.
70. Wang M, Karlsson JOM, Aksan A. FTIR Analysis of Molecular Changes Associated with Warming Injury in Cryopreserved Leukocytes. *Langmuir*. 2019 Jun 11; 35(23):7552–9.
71. Кононенко ІС, Бех ВВ. Кріоконсервування статевих продуктів — ефективний метод збереження біорізноманіття осетрових видів риби (огляд). *Рибогосподарська Наука України*. 2016. 2:5–21.
72. Усіпбек БА, Джумашева РТ, Жумагул МЖ, Аблайханова НТ, Есимсиитова ЗБ, Исаченко В. Технологические аспекты замораживания и хранения живых биологических объектов. *Вестник КазНМУ*. 2018; 1:493–6.
73. Чабаненко ЕА, Шапкина ОА, Орлова НВ, Шпакова НМ. Влияние глицерина на постгипертонический шок эритроцитов. *Вісник проблем біології і медицини*. 2018. 1(143):379–82.

74. Чабаненко ЕА, Орлова НВ, Шпакова НМ. Реакция эритроцитов на изменение температурно-осмотических условий среды в присутствии глицерина. Допов. Нац. акад. наук Укр. 2019; 2:84–9.

75. Семионова ЕА, Ершова НА, Ершов СС, Орлова НВ, Шпакова НМ. Особенности проявления постгипертонического лизиса эритроцитов некоторых млекопитающих. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2016. 26(1):73–83.

76. Костяев АА, Утёмов СВ, Андреев АА, и др. Четырёхклассная систематизация биокриоконсервантов. I класс хладоограждающих растворов – эндоцеллюлярные криоконсерванты. Вестник гематологии. 2016; 12(3):28–35.

77. Lovelock JE. The mechanism of the protective effect of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta*. 1953; 11:28–36.

78. Pegg DE. Red cell volume in glycerol/sodium chloride/water mixtures. *Cryobiology*. 1984; 21:234–239.

79. Костяев АА, Мартусевич АК, Андреев АА. Токсичность криопротекторов и криоконсервантов на их основе для компонентов крови и костного мозга (Обзорная статья). Научное обозрение. Медицинские науки. 2016; 6:54–74.

80. Awan M, Buriak I, Fleck R, et al. Dimethyl sulfoxide: a central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity? *Regenerative Medicine* [Internet]. 2020 [cited 2020 Feb 19]; 15(3). Available from: <https://doi.org/10.2217/rme-2019-0145>

81. Костяев АА, Утёмов СВ, Андреев АА, и др. Четырёхклассная систематизация биокриоконсервантов. II класс хладоограждающих растворов –экзоцеллюлярные криоконсерванты Вестник гематологии. 2016; 12(3):36–39.

82. Anchoroguy TJ, Rudolph AS, Carpenter JF, Crowe JH. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology*. 1987; 24:324–31.

83. Stolzing A, Naaldijk Y, Fedorova V, Sethe S. Hydroxyethylstarch in cryopreservation – mechanism, benefits and problems. *Transfus Apher Sci*. 2012; 46:137–47.

84. Huebinger J. Modification of cellular membranes conveys cryoprotection to cells during rapid, non-equilibrium cryopreservation. *PLoS One* [Internet]. 2018 Oct 10 [cited 2020 Oct 10]; 13(10):e0205520. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205520>

85. Костяев АА, Утёмов СВ, Андреев АА, и др. Четырёхклассная систематизация биокриоконсервантов. III класс хладоограждающих растворов – криоконсерванты смешанного действия. *Вестник гематологии*. 2016; 12(4):4–8.

86. Костяев АА, Утёмов СВ, Андреев АА, и др. Четырёхклассная систематизация биокриоконсервантов. IV класс хладоограждающих растворов – комбинированные криоконсерванты. *Вестник гематологии*. 2016; 12(4):9–12.

87. T’Joen V, De Grande L, Declercq H, Cornelissen M. An efficient, economical slow-freezing method for large-scale human embryonic stem cell banking. *Stem Cells Dev*. 2012; 21:721–8.

88. Moon JE, Lee JR, Jee BC et al Successful vitrification of human amnion-derived mesenchymal stem cells. *Hum Reprod*. 2008; 23:1760–70.

89. Нардид ОА, Черкашина ЯО, Иванов ЛВ, Нардид ЭО, Ляпунов АН, Мамонтов ВВ. Влияние пропиленгликоля и полиэтиленгликоля с молекулярной массой 1500 на микровязкость мембран эритроцитов. *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2016; 26(1):35–4.

90. Nardid OA, Schetinskey MI, Kucherenko YV. Dimethyl sulfoxide at high concentrations inhibits non-selective cation channels in human erythrocytes. *General Physiology and Biophysics*. 2013; 32(01):23–32.

91. Дюбко ТС. О некоторых аспектах применения флуоресцентного анализа в криобиологии. I. Собственная флуоресценция белков. Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. 2006; 3(729): 221–31.
92. Jang TH, Parka SC, Yang JH, Kim JY, Seok JH, Park US, Choi CW, Leeb SR, Han J Cryopreservation and its clinical applications. Integr Med Res. 2017; 6:12–8.
93. Pegg DE The role of vitrification techniques of cryopreservation in reproductive medicine. Hum Fertil (Camb). 2005; 8:231–239.
94. Kim CU, Tate MW, Gruner SM. Glass-to-cryogenic-liquid transitions in aqueous solutions suggested by crack healing. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2015; 112(38):11765–70.
95. Huebinger J, Han H-M, Hofnagel O, Vetter IR, Bastiaens PIH, Grabenbauer M. Direct Measurement of Water States in Cryopreserved Cells Reveals Tolerance toward Ice Crystallization. Biophys. J. 2016 Feb 23; 110(4):840–9.
96. Flores-Ramirez AJ, Garcia-Coronado P, Grajales-Lagunes A, Garcia RG, Archila MA, Cabrera MAR. Freeze-Concentrated Phase and State Transition Temperatures of Mixtures of Low and High Molecular Weight Cryoprotectants. Advances in Polymer Technology [Internet]. 2019 Feb [cited 2020 Oct 15]; 2019(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1155/2019/5341242>
97. Askeland DR, Wright WJ. Essentials of materials science and engineering. 4th edition. Boston: Cengage Learning; 2019. 752 p.
98. Wilson PW, Heneghan AF, Haymet ADJ. Ice nucleation in nature: supercooling point (SCP) measurements and the role of heterogeneous nucleation. Cryobiology. 2003. 46:88–98.
99. Baboo J, Kilbride P, Delahaye M. et al. The Impact of varying cooling and thawing rates on the quality of cryopreserved human peripheral blood T cells. Scientific Reports [Internet]. 2019 [cited 2020 Nov 2]; 9:3417. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39957-x>

100. Возовик К, Боброва Е, Присталов А, Шевченко Н, Кулешова Л. Стабильность аморфного состояния растворов для остекловывания растений *Biologija*. 2020; 66(1):47–53.
101. Steinmann W, Walter S, Beckers M, Seide G, Gries T. Thermal analysis of phase transitions and crystallization in polymeric fibers. In: Elkordy AA editor. *Applications of Calorimetry in a Wide Context - Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry*. 1st ed. InTech; 2013. p 277-306.
102. Wolynes PG, Lubchenko V, editors. *Structural glasses and supercooled liquids: Theory, experiment, and applications*. 1st ed. USA. John Wiley and Sons; 2012. 404 p.
103. Wowk B. Thermodynamic aspects of vitrification. *Cryobiology*. 2010; 60: 11–22.
104. Newman A, Zografi G. Commentary: considerations in the measurement of glass transition temperatures of pharmaceutical amorphous solids. *AAPS PharmSciTech* [Internet]. 2020 dec [cited 2020 Oct 10]; 21(26). Available from: <https://doi.org/10.1208/s12249-019-1562-1>
105. Arav A, Natan Y. The near future of vitrification of oocytes and embryos: looking into past experience and planning into the future. *Transfus Med Hemother*. 2019; 46:182–186.
106. Qian Z, Galuska L, McNutt WW, Ocheje MU, He Y, Cao Z, Gu X. Challenge and solution of characterizing glass transition temperature for conjugated polymers by differential scanning calorimetry. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* [Internet]. 2019 Sep 17 [cited 2020 Oct 3]; 57(23). Available from: <https://doi.org/10.1002/polb.24889>
107. Fahy G, Wowk B. Principles of Cryopreservation by Vitrification. In: Clifton NJ, editor. *Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press; 2015. Chapter 2. 1257:21-82.

108. Constantin JG, Schneider M, Corti HR. Glass Transition Temperature of Saccharide Aqueous Solutions Estimated with the Free Volume/Percolation Model. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2016; 120(22):5047–55.
109. Longinotti MP, Fuentes-Landete V, Loerting T, Corti HR. Glass transition of LiCl aqueous solutions confined in mesoporous silica. *J Chem Phys*. 2019; 151(6):064509.
110. Zhao L-S, Cao Z-X, Wang Q. Glass transition of aqueous solutions involving annealing-induced ice recrystallization resolves liquid-liquid transition puzzle of water. *Scientific Reports* [Internet]. 2015 Oct [cited 2020 Feb 10]; 5:15714. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep15714>
111. Drake AC, Lee Y, Burgess EM, Karlsson JOM, Eroglu A, Higgins AZ. Effect of water content on the glass transition temperature of mixtures of sugars, polymers, and penetrating cryoprotectants in physiological buffer. *PLoS ONE* [Internet]. 2018 [cited 2020 Feb 11]; 13(1): e0190713. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190713>
112. Poisson JS, Acker JP, Briard JG, Meyer JE, Ben RN. Modulating intracellular ice growth with cell permeating small molecule ice recrystallization inhibitors. *Langmuir*. 2019 Jun 11; 35(23):7452-8.
113. Hagivara T, Mao J, Suzuki T, Takai R. Ice Recrystallization in Sucrose Solutions Stored in a Temperature Range of -21 °C to -50°C. *Food Sci. Technol. Res*. 2005 Dec; 11 (4):407–11.
114. Gemmei-Ide M, Motonaga T, Kasai R, Kitano H. Two-Step Recrystallization of Water in Concentrated Aqueous Solution of Poly(ethylene glycol). *J. Phys. Chem. B*. 2013; 117:2188–2194.
115. Ampaw A, Charlton TA, Briard JG, Ben RN. Designing the next generation of cryoprotectants - From proteins to small molecules. *Peptide Science* [Internet]. 2018 [cited 2020 Oct 29]; 111(3): e24086. Available from: <https://doi.org/10.1002/pep2.24086>

116. Hasan M, Fayter AER, Gibson MI. Ice Recrystallization Inhibiting Polymers Enable Glycerol-Free Cryopreservation of Microorganisms. *Biomacromolecules*. 2018; 19(8):3371–6.
117. Chaytor JL, Tokarew JM, Wu LK, Leclere M, Tam RY, Capicciotti CJ, et al. Inhibiting ice recrystallization and optimization of cell viability after cryopreservation. *Glycobiology*. 2012 Jan; 22(1):123–33.
118. Briard JG, Jahan S, Chandran P, Allan D, Pineault N, Ben RN Small-molecule ice recrystallization inhibitors improve the post-thaw function of hematopoietic stem and progenitor cells. *ACS Omega*. 2016 Nov 28; 1(5):1010–18.
119. Тодрин АФ, Попивненко ЛИ, Коваленко СЕ. Теплофизические свойства криопротекторов. I. Температура и теплота плавления. *Проблемы криобиологии*. 2009. 19(2):163–76.
120. Wåhlin J, Klein-Paste A. The effect of mass diffusion on the rate of chemical ice melting using aqueous solutions. *Cold Regions Science and Technology*. 2017; 139:11–21.
121. Ferrari C, Tombari E, Salvetti G, Johari GP. Composition dependence and the nature of endothermic freezing and exothermic melting. *J. Chem. Phys.* [Internet]. 2007 Mar 29 [cited 2020 Oct 20]; 126(12):124506. Available from: <https://doi.org/10.1063/1.2711179>
122. Perez AF, Taing KR, Quon JC, Flores A, Ba Y. Effect of type I antifreeze proteins on the freezing and melting processes of cryoprotective solutions studied by site-directed spin labeling technique. *Crystals*. 2019; 9(7):352.
123. Celik Y, Drori R, Graham L, Mok Y-F, Davies PL, Braslavsky I. Freezing and melting hysteresis measurements in solutions of hyperactive antifreeze protein from an Antarctic bacteria. In: Furukawa Y, Sazaki G, Uchida T, Watanabe N, editors. *Physics and Chemistry of Ice*. Sapporo: Hokkaido University Press; 2011. p.403–9
124. Гаспарян РА, Гаспарян ОР, Машков ЮА, Беляев ВМ. Влияние скорости нагревания на термодинамические параметры фазового перехода

кристалл-расплав в линейных гибкоцепных полимерах. Альманах современной науки и образования. 2013; 5(72):42–5.

125. Klein-Paste A, Potapova J. Thermal aspects of melting ice with deicer chemicals. Transportation research record. Journal of the Transportation Research Board. 2014; 2440(1): 69–75.

126. Shum E, Papangelakis V. Water recovery from inorganic solutions via natural freezing and melting. Journal of Water Process Engineering. 2019 Oct; 31:100787.

127. Brown GH. Advances in Liquid Crystals. Academic Press. 1975 Sep 28; 1(1): 332 p.

128. Keskin M, Özgan S. A theory of melting of molecular crystals I. Theory and evaluation of the thermodynamic properties of melting. Molecular crystals and liquid crystals science and technology. Section A. Molecular Crystals and Liquid Crystals. 1995; 269(1):149–63.

129. Poirier J-P. Introduction to the Physics of the Earth's Interior. Cambridge University Press. 2000. 312 p.

130. Кудрявцев АА, Кудрявцева ЛА Клиническая гематология животных. М.:Колос; 1974. 398 с.

131. Зинченко АВ. Исследование фазовых переходов и физических состояний водных растворов многоатомных спиртов в диапазоне температур $-150^{\circ}\text{C} \div 0^{\circ}\text{C}$. автореф. дисс. на соискание научн. степени канд. физ.-мат. наук : спец. 01.04.15 – молекулярная физика. К.; 1983. 20 с.

132. Уэндладт У. Термические методы анализа. М.:Мир; 1978. 526 с.

133. Дервиз ГВ, Бялко НК. Уточнение метода определения гемоглобина, растворенного в плазме крови. Лаб. Дело. 1966; 8:461–4.

134. Тодоров Й. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. Газенко ГГ, редактор. 4-е рус. изд. София: Медицина и физкультура; 1963. 874 с.

135. Горячая ИП, Дюбко ТС, Зинченко ВД, Буряк ИА, Паценкер ЛД, Татарец АЛ. Сквараиновый краситель Square-460 как маркер повреждения

мембран при криовоздействиях. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2013. 23(4):347–50.

136. Won DI, Suh JS. Flow cytometric detection of erythrocyte osmotic fragility. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* [Internet]. Wiley; 2009 Mar [cited 2019 Nov 3]; 76B(2):135–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.b.20448>

137. Єгоров МІ, Дюбко ТС, Ліннік ТП та ін. Нові флуоресцентні барвники як зонди для дослідження сперматозоїдів собак у криозахисних середовищах. *Проблемы криобиологии*. 2006; 16(1):13–23.

138. Буряк ІА, Зинченко ВД, Дюбко ТС и др. Применение новых флуоресцентных красителей в криобиологических исследованиях. *Проблемы криобиологии*. 2008; 18(1): 17–21.

139. Bessis M. *Living Blood Cells and Their Ultrastructure*. Berlin and Heidelberg: Springer-Verlag GmbH & Co. KG; 1973. 767 p.

140. Жегунов ГФ, Денисова ГФ, Землянских НГ. Криоконсервирование и сохранность эритроцитов животных. *Проблемы криобиологии*. 2005; 15(30):566–9.

141. Sputtek A. Cryopreservation of red blood cells and platelets. *Methods in Molecular Biology*. 2007; 368:283–301.

142. Землянских НГ, Коваленко ИФ, Бабийчук ЛА. Особенности модификации геометрических параметров и изменения осмотической хрупкости эритроцитов человека под влиянием сахарозы и ПЭГ-1500. *Проблемы криобиологии и криомедицины*. 2017; 27(4):296–310.

143. Зубов ПМ. Изменение липидной асимметрии мембран эритроцитов кордовой и донорской крови при криоконсервировании с ПЭО-1500. *Вісник проблем криобіології і медицини*. 2013; 2(2):109–12.

144. Криоконсервування клітин донорської крові та їх довгострокове зберігання у низькотемпературних банках. *Збірник нормативно-директивних документів з охорони здоров'я*. 2015; 8:13–30.

145. Hon M, Thomovsky EJ, Brooks AC, Johnson PA. Cryopreservation of feline red blood cells in liquid nitrogen using glycerol and hydroxyethyl starch. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2020 Apr; 22(4):366–75.
146. Зинченко АВ, Боброва ЕН, Щетинский МИ. Влияние глицерина и 1,2-пропандиола на фазовые переходы и стеклование в суспензии эритроцитов кордовой крови при температуре ниже 0°C. *Доповіди НАН України*. 2003; 12:155–60.
147. Зинченко АВ, Боброва ЕН, Щетинский МИ. Влияние ДМСО на фазовые переходы и стеклование в суспензии эритроцитов кордовой крови ниже 0°C. *Проблемы криобиологии*. 2003. 2:16–21.
148. Мусатова ИБ, Прокопюк ОС, Волина ВВ, Прокопюк ВЮ. Создание криозащитных сред для сохранения эксплантов ткани плаценты. *Biotechnologia Acta*. 2013; 6(6):132–8.
149. Shah BN, Schall CA. Measurement and modeling of the glass transition temperatures of multi-component solutions. *Thermochimica Acta*. 2006; 443:78–86.
150. Ciccone L, Vera L, Tepshi L, Rosalia L, Rossello A, Stura EA. Multicomponent mixtures for cryoprotection and ligand solubilization. *Biotechnology Reports*. 2015 Sep; 7:120–7.
151. Зінченко ОВ. Фізико - хімічні процеси в криобіологічних системах при склуванні і в твердій фазі: автореф. дисс. на соискание научн. степени докт. біол.наук. Харків; 1997. 44 с.
152. Anastasiadi AT, Tzounakas VL, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Seghatchian J, Antonelou MH. When I need you most: frozen red blood cells for transfusion. *Transfusion and Apheresis Science* [Internet]. 2020 June 01 [cited 2020 Nov 04]; 59(3): 102786 Available from: <https://doi.org/10.1016/j.transci.2020.102786>
153. Ling GN, Zhang ZL. Studies of the physical state of water in living cells and model systems. IV: Freezing and thawing point depression of water by

gelatin, oxygen-containing polymers and urea-denatured proteins. *Physiol. Chem. and Phys. and Med. NMR*. 1983; 15:391–406.

154. Zhang ZL, Ling GN. Studies of the physical state of water in living cells and model systems. V: The warming exothermic reaction of frozen aqueous solution of polyvinylpyrrolidone, poly(ethylene oxide), and urea-denatured proteins. *Physiol. Chem. and Phys. and Med. NMR*. 1983; 15:407–15.

155. Шахпаронов МИ. Механизмы быстрых процессов в жидкостях. М.: Высшая школа; 1980. 325 с.

156. Зинченко АВ, Боброва ЕН. Влияние экстрактов плаценты человека на низкотемпературные фазовые переходы клеточных суспензий. Материалы VI Международной научно-технической конференции “Актуальные вопросы теоретической и прикладной биофизики, физики и химии. “БФФХ-2010”. *Биофизика и биофизическая медицина*. 2:111-4.

157. Yamamoto A, Saito N, Yamauchi Y, Takeda M, Ueki S, Itoga M et al. Flow cytometric analysis of red blood cell osmotic fragility. *Journal of Laboratory Automation* [Internet]. SAGE Publications; 2014 Oct [cited 2020 Feb 19]; 19(5):483–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/2211068214532254>

158. Piagnerelli M, Zouaoui Boudjeltia K, Brohee D, Vereerstraeten A, Piro P, Vincent J-L, Vanhaeverbeek M. Assessment of erythrocyte shape by flow cytometry techniques. *J Clin Pathol*. 2007 May; 60(5):549–54.

159. Денисова ОН, Кулешова ЛГ, Землянских НГ и др. Морфологические изменения эритроцитов животных после криоконсервирования. *Проблемы криобиологии*. 2007; 17(2):150–5.

160. Денисова ОН, Жегунов ГФ. Изучение содержания АТФ в эритроцитах млекопитающих после криоконсервирования. *Проблемы зооінженерної та ветеринарної медицини*. 2007; 14:42–6.

161. Baskurt ОК, Farley RA, Meiselman HJ. Erythrocyte aggregation tendency and cellular properties in horse, human, and rat: a comparative study. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* [Internet]. 1997

Dec [cited 2020 Oct 28]; 273(6):H2604–H2612. Available from: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.1997.273.6.h2604>

162. Best BP. Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. *Rejuvenation Research*. 2015 Oct 1; 18(5):422–36.

163. Anchordoguy TJ, Carpenter JF, Crowe JH, et al. Temperature-dependent perturbation of phospholipids-bilayers by dimethylsulfoxide. *Biochim.Biophys.Acta*. 1992; 1104:117–22.

164. Elliott GD, Wang S, Fuller BJ. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology*. 2017 Jun; 76:74–91.

165. Bala D, Eraslan E, Akyazi I, Ekiz E, Ozcan M, Cotelioglu U, Arslan M. Freezing and storage of leukodepleted erythrocyte suspensions. *Veterinární Medicína*. 2017; 61(8):443–448.

166. Шпакова НМ Температурна та осмотична стійкість еритроцитів різних видів ссавців. Автореф. дис. ... докт. біол. наук. Харків; 2014. 43 с.

167. Гулевский АК Барьерно–транспортные свойства плазматических мембран в процессе криоконсервирования. Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Харьков; 1986. 42 с.

168. Betticher DC, Geiser J. Resistance of mammalian red blood cells of different size to hypertonic milieu. *Comp. Biochem. Physiol*. 1989; 93(2):429–32.

169. Nouri–Sorkhabi MH, Agar NS, Sullivan DR et al. Phospholipid composition of erythrocyte membranes and plasma of mammalian blood including Australian marsupials; quantitative ³¹P NMR analysis using detergent. *Comp. Biochem. Physiol*. 1996; 113(2):221–7.

170. Abramowicz JS, Miller MW, Battaglia LF, Mazza S. Comparative hemolytic effectiveness of 1 MHz ultrasound on human and rabbit blood in vitro. *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2003; 29(6):867–73.

171. Pollock K, Yu G, Moller-Trane R. et al. Combinations of osmolytes, including monosaccharides, disaccharides, and sugar alcohols act in concert during

cryopreservation to improve mesenchymal stromal cell survival. *Tissue Engineering: Part C*. 2016; 22(11):999–1008.

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у фахових журналах України

1. **Ulizko PYu**, Bobrova OM, Nardid OA, Zubov PM, Kovalenko IF, Kuchkov VM, Vodopianova LA. Cryopreservation of equine and bovine erythrocytes using combined protective media. *ProblCryobiolCryomed*. 2019;29(3):255-65. (*Scopus*) DOI: 10.15407/cryo29.03.255

2. **Улизко ПЮ**, Жегунов ГФ, Боброва ЕН, Зинченко АВ. Влияние смесей криопротекторов на сохранность криоконсервированных эритроцитов млекопитающих. *Вісник проблем біології і медицини*. 2011;3(3):26-9. (*eLIBRARY.ru*)

3. **Улизко ПЮ**, Боброва ЕН, Зинченко АВ, Жегунов ГФ. Фазовые переходы и стеклование в криозащитных средах и суспензиях эритроцитов лошади ниже 0°C. *Вісник проблем біології і медицини*. 2011; 3(2):253-6. (*eLIBRARY.ru*)

4. **Улизко ПЮ**, Жегунов ГФ, Денисова ОН. Влияние криоконсервирования с ДМСО на сохранность и осмотическую хрупкость эритроцитов различных видов млекопитающих. *Проблемы криобиологии*. 2011;21(1):52-7. (*eLIBRARY.ru*)

Статті в наукових журналах інших країн

5. **Ulizko P**, Bobrova E, Nardid O, Vodopyanova L, Repina S. New cryoprotective media for cryopreservation of mammal erythrocytes. *Trakia Journal of Sciences*. 2019;17(4):303-7. DOI: 10.15547/tjs.2019.04.001

6. **Улизко ПЮ**, Боброва ЕН, Жегунов ГФ. Осмотические свойства эритроцитов млекопитающих, криоконсервированных в присутствии комбинированных криозащитных сред. *Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук*. 2014;6(1):100-7. (*eLIBRARY.ru*)

Статті в інших наукових журналах

7. **Ulizko PY**, Bobrova OM, Nardid OA, Zubov PM, Novorova YuS, Kovalenko IF. Evaluation of efficiency of equine erythrocyte cryopreservation using fluorescent dyes *Альманах науки*. 2018;13(4):14-7.

Статті в збірках матеріалів конференцій

8. **Ulizko P**, Bobrova O, Nardid E, Goriacha I, Schetinsky M. Cryopreservation of animals' erythrocytes. Proceedings of the International Academic Congress. European Research Area: Status, Problems and Prospects. Section 2 Biology; 2016. Latvia, Riga; p. 13-15.

9. **Улизко ПЮ**, Боброва ЕН, Кучков ВН, Водопьянова ЛА, Говорова ЮС. Современные методы долгосрочного хранения эритроцитов сельскохозяйственных животных. Актуальные проблемы зоологической науки в Беларуси. Сборник статей XI Зоологической Международной научно-практической конференции; 2017. Беларусь, Минск: А.Н. Вараксин; 1:393-7.

Тези конференцій

10. **Ulizko P**, Bobrova O, Vodopyanova L, Mangasarov D. Complex cryopreservation medium for mammalian erythrocytes. *Cryo 2020*. The 57th annual meeting of the Society for cryobiology. Abstracts; 2020 July 21-23; Virtual annual meeting; 2020, p.65.

11. **Ulizko PYu**, Bobrova OM, Vodopyanova LA. Application of Fluorescent Dyes to Assess the State of Bovine and Equine Erythrocytes after Cryopreservation. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2018;28(2):189. (*Scopus*)

12. **Ulyzko PYu**, Bobrova OM, Vodopyanova LA. Influence of Low-Temperature Phase Transitions on Erythrocytes Integrity. *ProblCryobiolCryomed*. 2019;29(2):179. (*Scopus*)

13. **Улізко ПЮ**, Боброва ОМ. Низькотемпературні фазові переходи під час кріоконсервування еритроцитів коня з використанням комбінованих кріозахисних середовищ. *Проблеми криобіології і криомедицини*. 2017;27(2):178. (*Scopus*)

14. Говорова ЮС, Зінченко ОВ, Боброва ОМ, Нардід ОА, Репіна СВ, **Улізко ПЮ**. Вплив 1,2-пропандіолу на конформаційну стабільність гемоглобіну бика і коня. Біологія тварин. 2018; 20(3):105.

15. **Улізко ПЮ**, Боброва ЕН, Нардід ОА, Водопьянова ЛА, Кучков ВН. Применение комбинированной криозащитной среды при криоконсервировании эритроцитов человека, быка, коня и кролика. Стратегії інноваційного розвитку природничих дисциплін: досвід, проблеми та перспективи; 2019; Кропивницький, 141-2.

16. Житняковська ОА, **Улізко ПЮ**, Соколик ОА, Дюбко ТС, Жегунов ГФ. Дослідження кріочутливості еритроцитів тварин в умовах низькотемпературного консервування із застосуванням флуоресцентних методів. Збірник тез VI Міжнар. наук. конфер. Молодь і поступ біології; 2010; Львів, с.9.

17. **Улізко ПЮ**, Боброва ЕН, Жегунов ГФ, Зінченко АВ. Применение комбинированных криозащитных сред при криоконсервировании эритроцитов млекопитающих. Биология – наука XXI века. 17-я Международная Пущинская школа- конференция молодых ученых. Сборник тезисов. 2013 апр. 21-26; Пущино; 2013, с. 157-8.

18. **Улізко ПЮ**, Боброва ОМ. Вплив кріопротекторів і низьких температур на збереженість еритроцитів бика, коня та кролика. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2016; 26(2):184.

19. Sokolyk O, Dyubko T, Linnik T, Tatars A, **Ulizko P.** et al. Investigation of the cryoprotectant-initiated changes of horse and goat erythrocyte membranes using fluorescent probe SQUARE-660. 17 th International symposium “EARCR”. Milano, Italy, 23-27 April 2009, p. 77.

Патенти України на корисну модель

20. Патент №106776, Україна, МПК G01N 24/14(2006.01). Заявл. 19.10.2015, з.н. u201510201. Спосіб кріоконсервування еритроцитів тварин. Публ.10.05.2016. Бюл.№9. Заявник **П.Ю. Улізко**, О.М. Боброва, О.А. Нардід, О.В. Зінченко, Г.Ф. Жегунов, Л.А. Водоп'янова.

21. ДОДАТОК Б

ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

Матеріали дисертаційної роботи представлені на вітчизняних та міжнародних конференціях серед яких:

- 17 th International symposium “EARCR” (Milano, Italy, 23-27 April 2009);
- VI Міжнародна наукова конференція «Молодь і поступ біології» (м. Львів, Україна, 21–24 вересня 2010 р.);
- 17-та Міжнародна Пушчинська школа - конференція молодих вчених «Биология – наука XXI века» (м. Пушино, Росія, 21 – 26 квітня 2013 р.);
- Міжнародна конференція молодих вчених «Экспериментальная и теоретическая биофизика» (м. Пушино, Росія, 2015 р.);
- 40-а щорічна конференція молодих вчених «Холод в біології та медицині» (м. Харків, Україна, 23-24 травня 2016 р.);
- Міжнародна конференція «European Research Area: Status, Problems and Prospects » (м. Рига, Латвія, 1-2 вересня 2016 р.);
- XI Зоологічна Міжнародна науково-практична конференція «Актуальные проблемы зоологической науки в Беларуси» (м. Мінськ, Білорусь, 1-3 листопада 2017 р.);
- 41-а щорічна конференція молодих вчених "Холод в биологии и медицине. Актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии" (м. Харків, Україна, 24-25 травня 2017 р.);
- 42-а щорічна конференція молодих вчених «Холод в біології та медицині» (м. Харків, Україна, 23-24 травня 2018 р.);
- 43-я щорічна конференція молодих вчених «Холод в біології та медицині» (м. Харків, Україна, 27-29 травня 2019 р.);
- II Всеукраїнська науково-практична конференція «Стратегії інноваційного розвитку природничих дисциплін: досвід, проблеми та перспективи» (м. Кропивницький, Україна, 21 березня 2019 р.);
- The 57th annual meeting of the Society for cryobiology “Cryo 2020” (Virtual annual meeting, USA, 21-23 July 2020).