

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

**УЛІЗКО ПАВЛО ЮРІЙОВИЧ**

УДК: 591.111.1:57.086.13:547.42:547.569.2:544.344.015.4

**КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ЕРИТРОЦИТІВ ССАВЦІВ ІЗ  
ЗАСТОСУВАННЯМ КОМБІНОВАНИХ КРІОЗАХИСНИХ СЕРЕДОВИЩ**

03.00.19 – кріобіологія

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

**Харків – 2021**

**Дисертацією є рукопис.**

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України і Харківській державній зооветеринарній академії.

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук, професор  
**Нардід Олег Анатолійович,**  
Інститут проблем кріобіології і  
кріомедицини НАН України,  
завідувач відділу кріобіофізики.

**Офіційні опоненти:** доктор медичних наук, професор  
**Тимченко Анатолій Сергійович,**  
Таврійській національний університет  
ім. В.І. Вернадського, м. Київ,  
професор загальноуниверситетської кафедри  
фізичного виховання, спорту  
та здоров'я людини;

кандидат фізико-математичних наук,  
**Горбченко Ольга Олександрівна,**  
Харківській національний університет  
ім. В.Н. Каразіна,  
доцент кафедри молекулярної  
і медичної біофізики.

Захист відбудеться «22» квітня 2021 р. о 13:30 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Автореферат розісланий «19» березня 2021 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01

О. В. Фалько

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** В останні роки у ветеринарній медицині значно зросла потреба у трансфузіях крові тварин (Proverbio D. et al., 2020, Le Gal A. et al., 2020, Martinez&Sogues L. et al., 2020). Це стосується і маленьких домашніх тварин, таких як коти, собаки, кролі (Kumar R., 2017, Sink C., 2017, Webb G., 2019), так і великих сільськогосподарських, таких як бики і коні (Mair T., 2016, Mudge M.C., 2014, Saritha G. et al., 2016). Є дані про переливання як цільної крові, так і її компонентів (еритромаси, тромбоконтративів, плазми та ін.). Компоненти крові тварин застосовуються при отруєннях, надмірній втраті крові, порушеннях імунної системи та ін. (Yagi K. et al., 2016, Sink C., 2017). Переливання крові від однієї тварини до іншої можливо лише після ретельно проведених досліджень, які дозволяють виключити у донора кровопаразитарні та інфекційні захворювання (Keeble E. et al., 2016, Mair T., 2016). 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 (Yagi K. et al., 2016, Wilder A. et al. 2019).

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 (Pogozhykh D. et al., 2017, Денисова О.Н. и др., 2005). Диметилсульфоксид (ДМСО) має більш високу кріозахисну ефективність по відношенню до еритроцитів деяких тварин, але рівень гемолізу після всіх етапів кріоконсервування досить високий (Денисова О.Н., 2006). 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 (Денисова О.Н., 2006). Виявлено, що для деяких видів біологічних об'єктів більш ефективними є комбіновані кріозахисні середовища, які містять комбінацію ендо- та екзоцелюлярних кріозахисних сполук (Пахомова Ю.С. и др., 2013, Hvozdiuk Y.V. et al., 2020).

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 (Жегунов Г.Ф. и др., 2019, Зинченко А.В. и др., 2015). Зміни біохімічних показників клітин при охолодженні можуть тривати після кристалізації основної маси розчинника до температури повного тверднення у склоподібному стані рідкої фази, яка залишилася. 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°C в біологічних об'єктах при використанні багатокомпонентних кріозахисних середовищ. Становило інтерес дослідити низькотемпературні фазові переходи і склування у комбінованих середовищах та суспензіях еритроцитів ссавців, а також оцінити збереженість еритроцитів після кріоконсервування під захистом комбінованих кріозахисних середовищ.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.** 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 в 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 дослідження* – низькотемпературні фазові переходи, кріопшкодження еритроцитів ссавців.

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

**Методи дослідження:** В роботі використані сучасні біофізичні та кріобіологічні методи: низькотемпературна диференціальна скануюча калориметрія

(ДСК), флуоресцентна мікроскопія, проточна цитофлуориметрія, спектрофотометрія, моделювання трансфузії еритроцитів, визначення осмотичної крихкості, статистичний аналіз результатів.

**Наукова новизна отриманих результатів.** У дисертаційній роботі вперше досліджені фізичні процеси в суспензіях еритроцитів ссавців з комбінованими криозахисними середовищами при охолодженні до  $-196^{\circ}\text{C}$  та проаналізовано закономірності впливу різних криозахисних 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 криозахисних середовищах, які містять ПЕО-1500, ДМСО, 1,2-ПД і сахарозу підвищується в порівнянні з температурою склування однокомпонентних середовищ на основі ДМСО. Показано, що застосування комбінованих криозахисних середовищ дозволяє уникнути розвитку кристалізації евтектичних складів, характерних при застосуванні в складі криозахисного середовища тільки ПЕО-1500 або ДМСО, що дозволяє виключити один з факторів кріопошкоджень.

Уперше проаналізовано вплив зміни концентрації компонентів комбінованого середовища на гемоліз еритроцитів бика, коня і 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. Збереженість еритроцитів бика, кролика і коня вища після кріоконсервування з комбінованими криозахисними середовищами, ніж з однокомпонентними.

Розроблено та запатентовано нове криозахисне 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 криозахисному середовищі осмотичні властивості деконсервованих еритроцитів ссавців кращі і при моделюванні трансфузії рівень їх гемолізу нижче, ніж с середовищем на основі ДМСО.

**Практичне значення отриманих результатів.** 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 криозахисних 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 криозахисних 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.

**Апробація результатів дисертації.** Матеріали дисертаційної роботи представлені на вітчизняних та міжнародних конференціях серед яких: 17-й міжнародний симпозіум «EARCR» (Italy, Milano, 2009); VI міжнародна наукова конференція «Молодь і поступ біології» (Україна, Львів, 2010); 17-а міжнародна Пушчинська школа - конференція молодих учених «Биология – наука XXI века» (Росія, Пушино, 2013); міжнародна конференція молодих учених «Экспериментальная и теоретическая биофизика» (Росія, Пушино, 2015); 40-а, 41-а, 42-а та 43-я щорічна конференція молодих вчених «Холод в біології та медицині» (Україна, Харків, 2016, 2017, 2018, 2019); міжнародна конференція «European Research Area: Status, Problems and Prospects» (Латвія, Рига, 2016); XI Зоологічна міжнародна науково-практична конференція «Актуальные проблемы зоологической науки в Беларуси» (Білорусь, Мінськ, 2017); II Всеукраїнська науково-практична конференція «Стратегії інноваційного розвитку природничих дисциплін: досвід, проблеми та перспективи» (Україна, Кропивницький, 2019); 57-и щорічні збори Товариства кріобіології “Cryo 2020” (USA, Virtual annual meeting, 2020).

**Публікація матеріалів.** За результатами отриманих у дослідженні даних опубліковано 20 наукових робіт: 2 статті у закордонних наукових журналах, 4 статті у наукових фахових журналах України (1 входить до міжнародної наукової бази Scopus), 2 статті у збірниках матеріалів конференцій (загалом 2 наукові статті мають ідентифікатор DOI), 1 патент України на корисну модель. Опубліковано 10 тез доповідей.

**Обсяг і 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 та 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, розмічених на 20 сторінках тексту. Робота ілюстрована 33 рисунками (з яких 4 мікрофотографії) і 9 таблицями.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Огляд літератури.** У розділі представлено аналіз даних літератури щодо механізмів кріопшкодження і кріозахисту біологічних об'єктів, видів кріопротекторів і механізмів їх дії. Аналіз сучасних підходів до кріоконсервування клітинних суспензій показав, що вони найчастіше ґрунтуються на методі нерівноважної вітрифікації, при якому процеси кристалізації із переохолодженої рідини після розклування можуть бути вирішальними факторами, що пошкоджують клітини. Обґрунтовано доцільність вивчення низькотемпературних фазових переходів у комбінованих кріозахисних середовищах та визначення їх ефективності при кріоконсервуванні клітин.

**Матеріали і методи дослідження.** У розділі приведена характеристика об'єктів, матеріалів і методів дослідження. Дослідження проводилися на базі наукових підрозділів Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків) та Харківської державної зооветеринарної академії відповідно до принципів роботи з тваринами, які було схвалено Комітетом з біоетики ІПКіК НАН України (протокол №5 від 8.12.2020 р.).

Об'єктом дослідження були еритроцити бика (*Bos taurus*), коня (*Equus ferus caballus*), кролика (*Oryctolagus cuniculus*) та людини (*Homo sapiens*). Донорську кров людини (чоловіча, П+) заготовляли на консерванті «ЦФДА-1» («Масо Productions Pologne SP. Z.o.o.», Польща), кров тварин - на консерванті «Глюгіцир» (в об'ємному співвідношенні 1:4). Цільну кров ссавців центрифугували при 800 g протягом 3 хвилин, видаляли плазму, тоді еритроцити 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 ДМСО, 1,2-ПД, ПЕО-1500, гліцерин, сахарозу та маніт у різному відсотковому співвідношенні готували на фізіологічному розчині (рН 7,4). До отриманого осаду еритроцитів кріозахисні розчини 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°C до появи рідкої фази. Кріопротектор видаляли шляхом поетапного центрифугування. На першому етапі до суспензії еритроцитів додавали у рівному обсязі 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.

Дослідження фазових переходів і склування в області температур від -180°C до 0°C проводились за допомогою ДСК, який було розроблено і виготовлено в ІПКіК НАН України. 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. Температуру плавлення ( $T_m$ ) та кристалізації ( $T_c$ ) визначали за точкою перетину дотичної до піку з базовою лінією. Температуру склування ( $T_g$ ) визначали як середнє значення температур початку закінчення переходу або як точку перегину кривої. Похибка вимірювання температур не перевищувала  $\pm 0,2$  °C.

Ефективність кріопротекторів у різній комбінації оцінювали за гемолізом, осмотичною крихкістю, моделюванням трансфузії еритроцитів після кріоконсервування, методами флуоресцентної і світової мікроскопії та проточної цитофлуориметрії. Вимірювання гемолізу еритроцитів проводили спектрофотометричним методом при довжині хвилі 543 нм. Збереженість визначали відсотком негемолізованих клітин. Осмотичну крихкість визначали шляхом перенесення еритроцитів в розчини різної тонічності (0,2 - 0,9% NaCl) при кімнатній температурі. Концентрацію NaCl, при якій спостерігався 50% гемоліз визначали як індекс осмотичної крихкості. Моделювання трансфузії здійснювали перенесенням кріоконсервованих еритроцитів досліджуваних тварин у плазму або фізіологічний розчин і інкубуванням при 37°C протягом 24-х годин. Розведення еритроцитів при цьому складало 1:10, що відповідає встановленим процедурам трансфузії крові реципієнтам.

Для забарвлення еритроцитів було використано флуоресцентний барвник 3-DAB («SETA BioMedicals», США). Концентрація барвників в суспензії клітин при мікроскопічних дослідженнях становила 40 мкМ (Горячая И.П. и др., 2013), а при цитофлуориметричних вимірах - 4-7 мкМ (Єгоров М.І. и др., 2006). Клітини інкубували з барвником 15 хв і відмивали від вільного барвника центрифугуванням при 1300 г протягом 3 хв.

Флуоресцентні зображення еритроцитів отримували на флуоресцентному конфокальному мікроскопі «AxioObserverZ1» («Carl Zeiss», Німеччина) з імерсією при збільшенні  $\times 63$ . Флуоресцентні зображення клітин отримували поміщаючи краплину суспензії еритроцитів проміж предметним та покривним склом і рівномірно розподіляючи тонким шаром. Оцінку морфологічних особливостей еритроцитів здійснювали згідно класифікації (Bessis M., 1973).

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

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  $p < 0,05$ .

## Результати власних досліджень та їх обговорення

**Низькотемпературні фазові переходи і склування у суспензіях еритроцитів ссавців в присутності кріозахисних сполук.** При охолодженні та наступному відігріванні кріозахисних розчинів і клітинних суспензій може розвиватися ряд фізичних процесів, таких як кристалізація льоду, кристалізація евтектики, склування, рекристалізація та плавлення. Виявлено, що для розчинів ПЕО-1500 та ДМСО характерним є розвиток кристалізації і плавлення евтектичних складів, на відміну від розчинів гліцерину і 1,2-ПД (табл. 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	-	-

Температура склування розчинів ДМСО достовірно нижча, ніж всіх інших досліджених кріопротекторів, а розчинів ПЕО-1500 – достовірно вища за інші (рис. 1). Температура склування у комбінованому середовищі знижується при збільшенні концентрації ДМСО і підвищується при збільшенні концентрації ПЕО-1500 та при додаванні сахарози.

Показано, що у всіх досліджених комбінованих кріозахисних середовищах реєструється кристалізація на етапі нагріву (рис. 2), тобто при швидкому охолодженні утворюється нерівноважна аморфна фаза і швидкість нагрівання має вирішальне значення для того, щоб після розсклування у переохолодженій рідині не розпочалася кристалізація. Це надзвичайно важливо для кріобіології, оскільки кристалізація при нагріві і рекристалізація можуть діяти більш згубно, ніж кристалізація на етапі охолодження. 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.

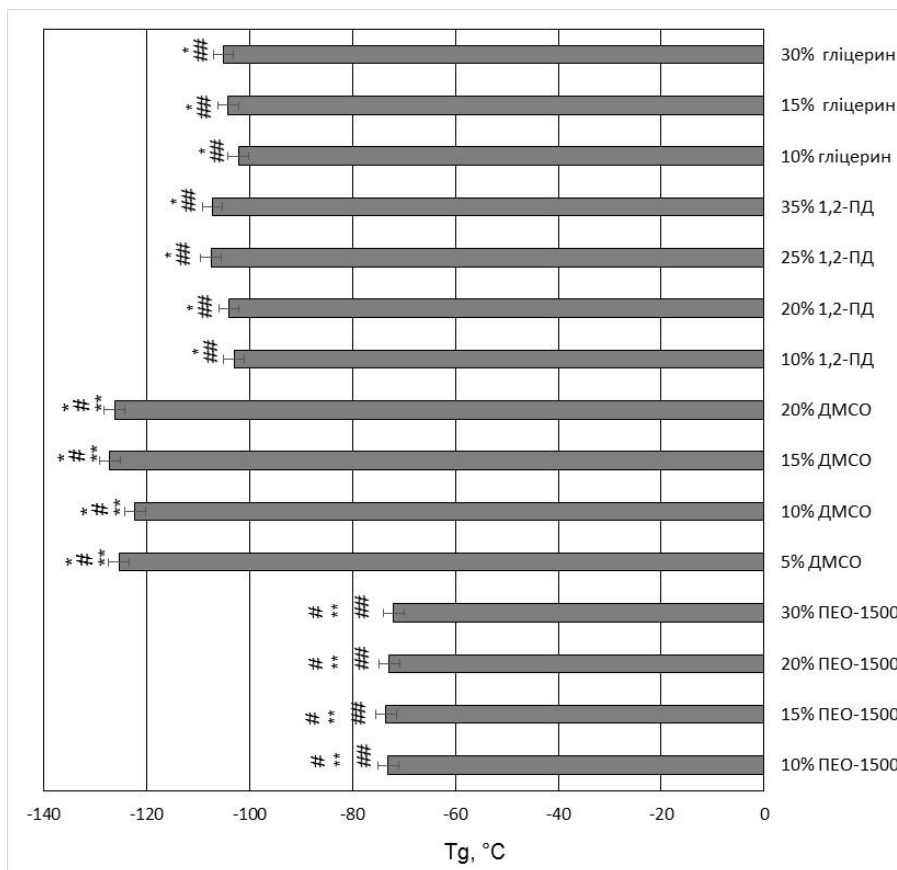


Рис. 1 Температура склування у однокомпонентних кріозахисних середовищах

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

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 (рис. 3).

Визначені температури фазових переходів і склування в суспензіях еритроцитів ссавців з широко вживаними в кріобіології кріопротекторами (гліцерин, 1,2-ПД, ДМСО і ПЕО-1500) та порівняно їх з фазовими переходами у суспензіях клітин з комбінованими кріозахисними середовищами. Виявлено, що температура склування еритроцитів в комбінованих середовищах, які містять ПЕО-1500, ДМСО, 1,2-ПД і сахарозу підвищується в порівнянні з температурою склування середовищ на основі ДМСО (табл. 2, рис. 1), що дозволяє збільшити діапазон можливих температур зберігання еритроцитів ссавців в цих середовищах.

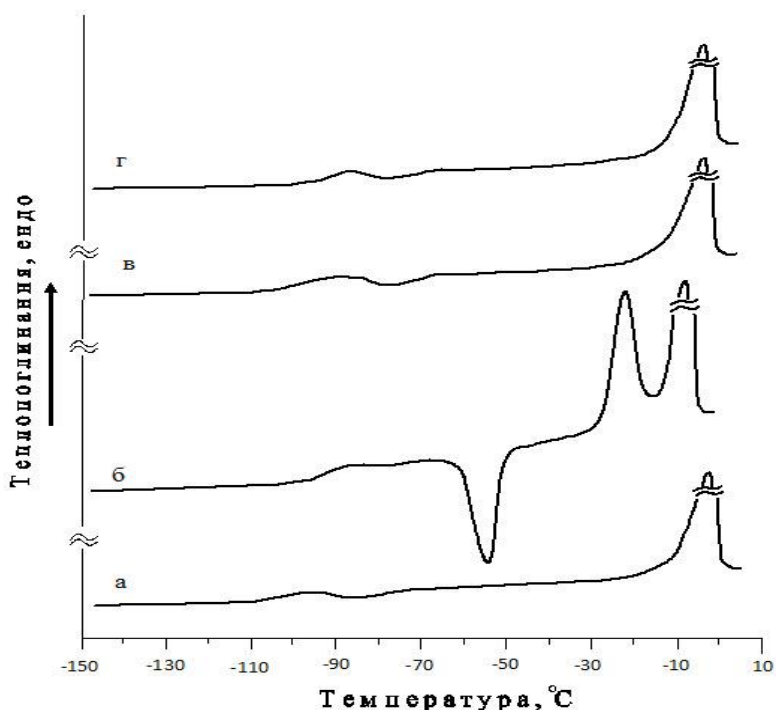


Рис. 2 ДСК-термограми комбінованих розчинів кріопротекторів: а – 10% ПЕО-1500+10% ДМСО; б – 20% ПЕО-1500 + 10% ДМСО; в – 7,5% ПЕО-1500 + 7,5% ДМСО + 2,5% 1,2-ПД + 2,5% сахароза; г – 10% ПЕО-1500 + 5% ДМСО + 2,5% 1,2-ПД + 2,5% сахароза

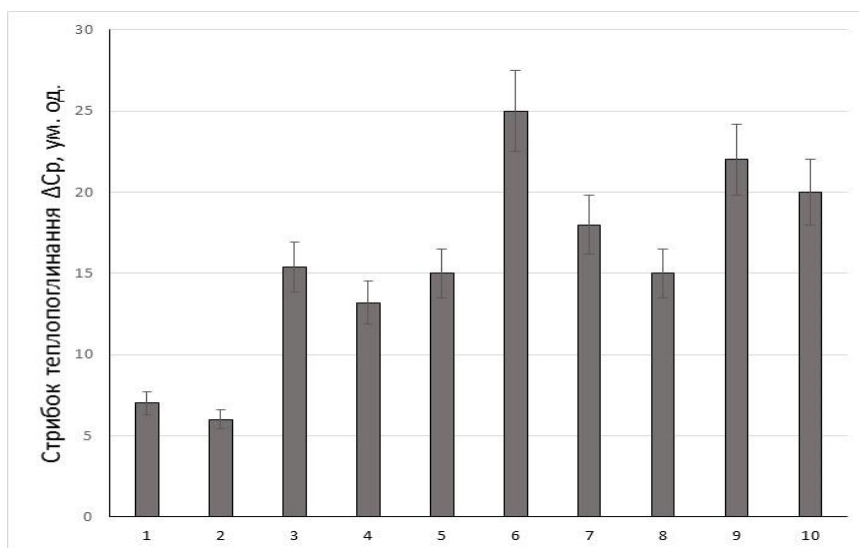


Рис. 3 Стрибок теплопоглинання при склуванні у комбінованих середовищах кріоконсервування: 1 – 2,5% ПЕО-1500+7,5% ДМСО; 2 – 5% ПЕО-1500 +5% ДМСО; 3 – 5% ПЕО-1500+15% ДМСО; 4 – 10% ПЕО-1500+5% ДМСО; 5 – 10% ПЕО-1500+10% ДМСО; 6 – 20% ПЕО-1500+10% ДМСО; 7 – 5% ПЕО-1500 + 5% ДМСО + 5% 1,2-ПД + 5% сахароза;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

Таблиця 2

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

Середовище	$T_g$ , °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.

Температура склування є показником дуже важливим при розробці протоколів кріоконсервування біооб'єктів, оскільки це температура повного тверднення, нижче за якої і потрібно зберігати зразки. Рекомендована температура зберігання еритроцитів коня, бика і кролика в середовищах, які містять ПЕО-1500, ДМСО, 1,2-ПД і сахарозу нижче  $-95^\circ\text{C}$ , що достовірно вище температури рекомендованої температури зберігання при використанні розчину ДМСО (нижче  $-125^\circ\text{C}$ ). 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.

**Збереженість еритроцитів на різних етапах кріоконсервування у присутності комбінованих кріозахисних середовищ.** Флуоресцентний барвник 3-DAВ 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-DAВ 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. Після заморожування-відігріву еритроцитів у присутності комбінованого кріозахисного середовища зміни розподілу клітин на цитограмі менш виражені, ніж у розчині ДМСО (рис. 4). 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.

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.

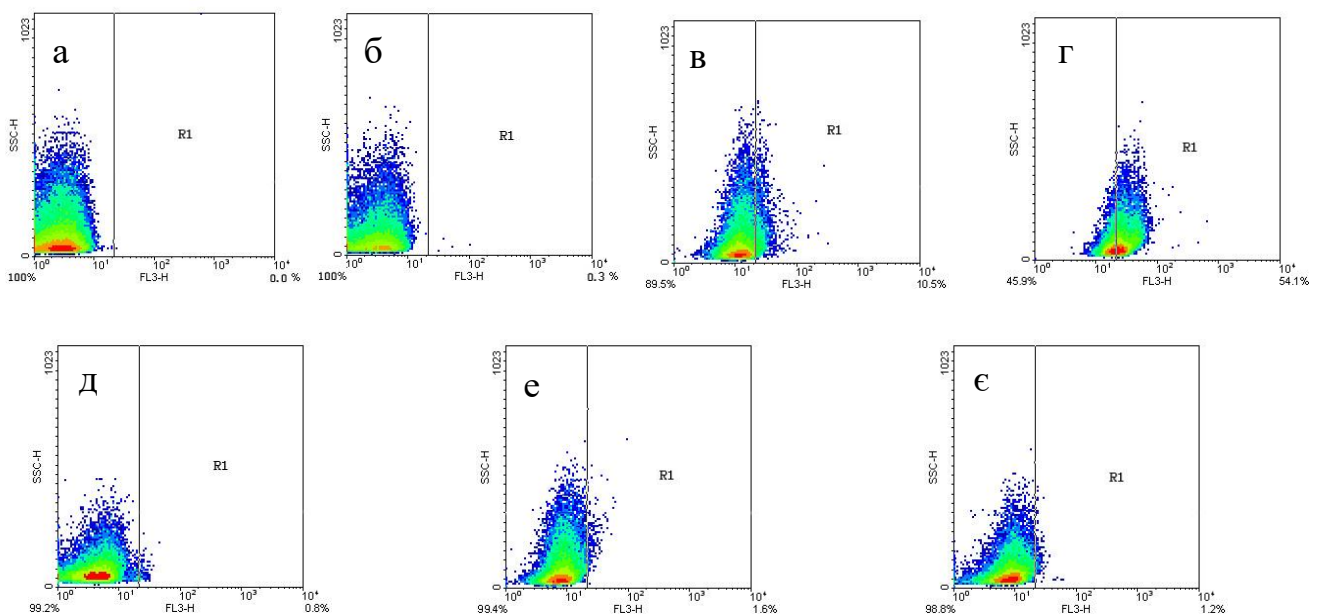


Рис. 4 Цитограми SSC/FL3-H еритроцитів коня: а - контроль, б - після інкубування у розчині ДМСО; в - після заморожування-відігрівання у розчині ДМСО; г - після заморожування-відігрівання у розчині ДМСО і відмивання; д - після інкубування у розчині ДМСО і ПЕО-1500; е - після заморожування-відігрівання у розчині ДМСО і ПЕО-1500; є - після заморожування-відігрівання у розчині ДМСО і ПЕО-1500 і відмивання

Мінімальний гемоліз досліджених еритроцитів ссавців після всіх етапів кріоконсервування виявлено при заморожуванні під захистом комбінованого кріозахисного середовища, яке містить 15% ПЕО-1500, 10% ДМСО, 5% 1,2-ПД та 5% сахарози. Показано, що після заморожування-відігріву в розробленому комбінованому середовищі гемоліз еритроцитів бика становить 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 (рис. 5).

Проведено порівняльний аналіз ефективності розробленого середовища і відомих однокомпонентних середовищ для кріоконсервування еритроцитів ссавців (рис. 5). Виявлено, що середовище на основі гліцерину не володіє достатньою ефективністю при кріоконсервуванні еритроцитів бика і коня. 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 (рис. 5). Високий рівень збережених еритроцитів всіх досліджених ссавців зареєстровано тільки після кріоконсервування під захистом комбінованого кріозахисного середовища.

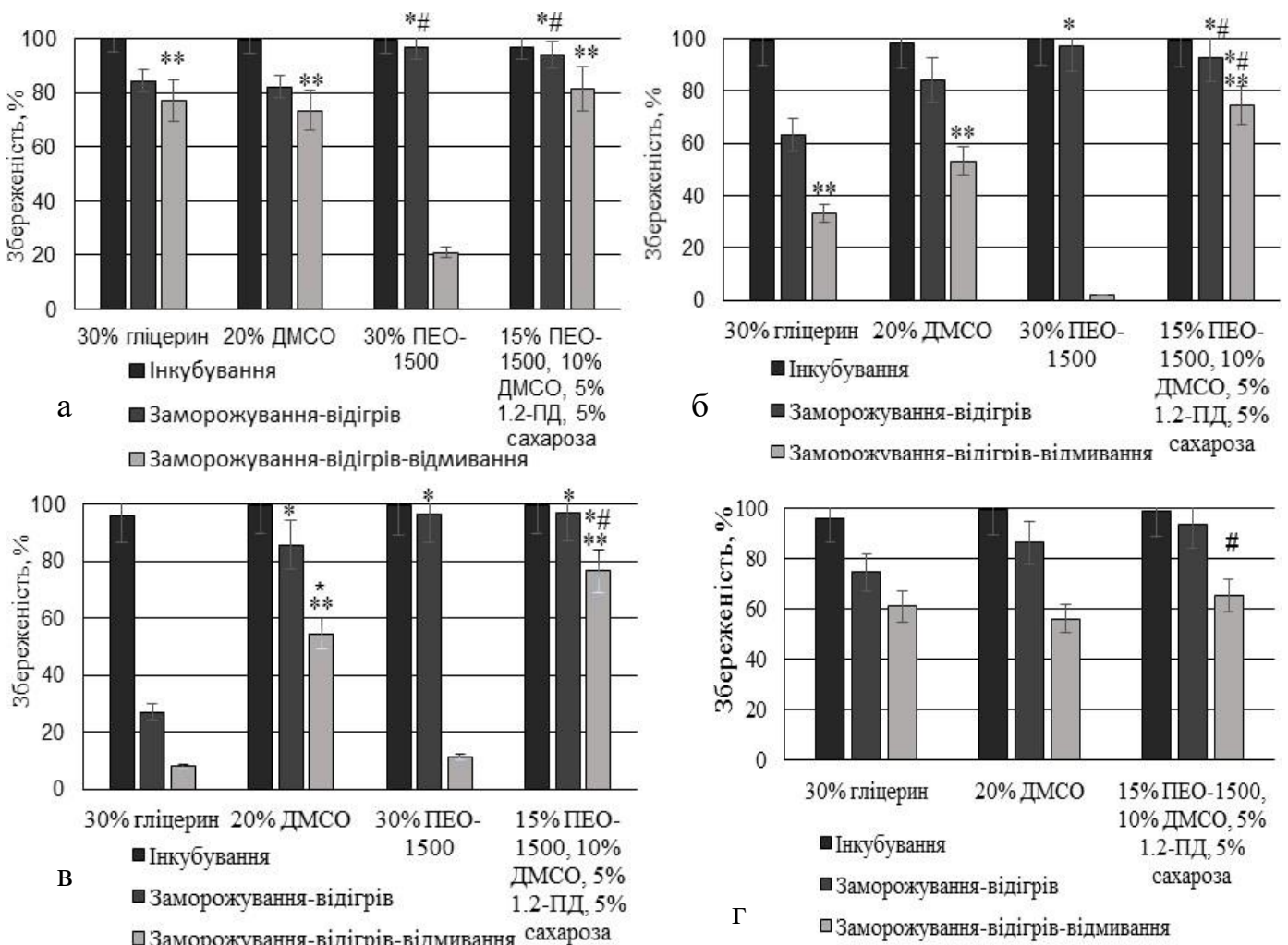


Рис. 5 Збереженість еритроцитів людини (а), коня (б), бика (в) та кролика (г) на різних етапах кріоконсервування з однокомпонентними та комбінованими середовищами

*Примітки:* \* - статистично значущі відмінності порівняно з кріозахисним розчином 30% гліцерину, 4% маніту ( $p < 0,05$ ); # - статистично значущі відмінності порівняно з 20% розчином ДМСО ( $p < 0,05$ ); \*\* - статистично значущі відмінності порівняно з 30% розчином ПЕО-1500 ( $p < 0,05$ ).

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 (рис. 6), що, можливо, свідчить про їх більшу осмотичну стійкість. Достовірні зміни осмотичної крихкості після всіх етапів кріоконсервування зареєстровано для еритроцитів коня, що свідкує про їх високу чутливість до факторів кріоконсервування.

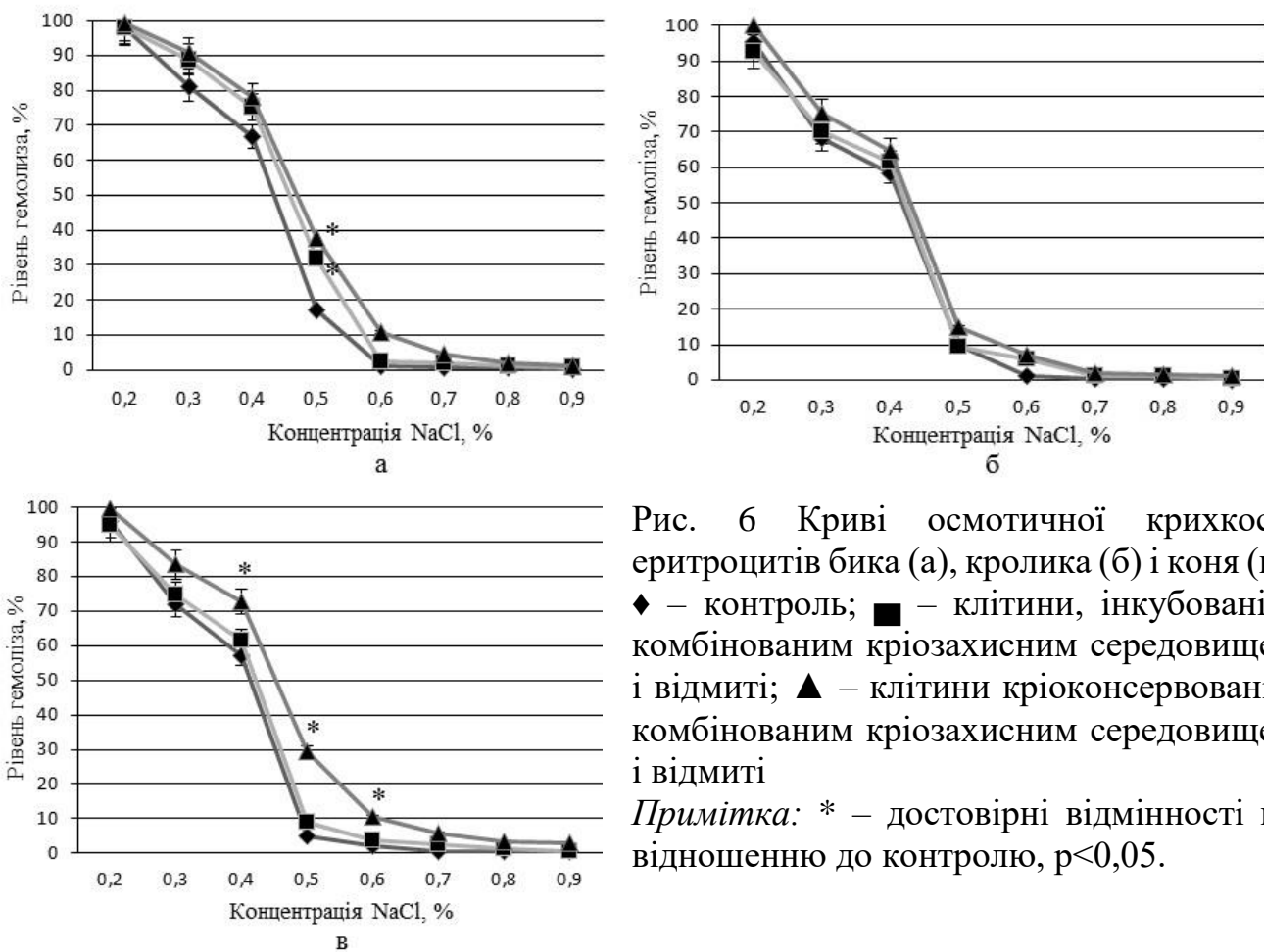


Рис. 6 Криві осмотичної крихкості еритроцитів бика (а), кролика (б) і коня (в): ◆ – контроль; ■ – клітини, інкубовані з комбінованим кріозахисним середовищем і відмиті; ▲ – клітини кріоконсервовані з комбінованим кріозахисним середовищем і відмиті

Примітка: \* – достовірні відмінності по відношенню до контролю,  $p < 0,05$ .

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  $37^{\circ}\text{C}$  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 (рис. 7). 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, 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 та подовжити можливий час їх життя після переливання.

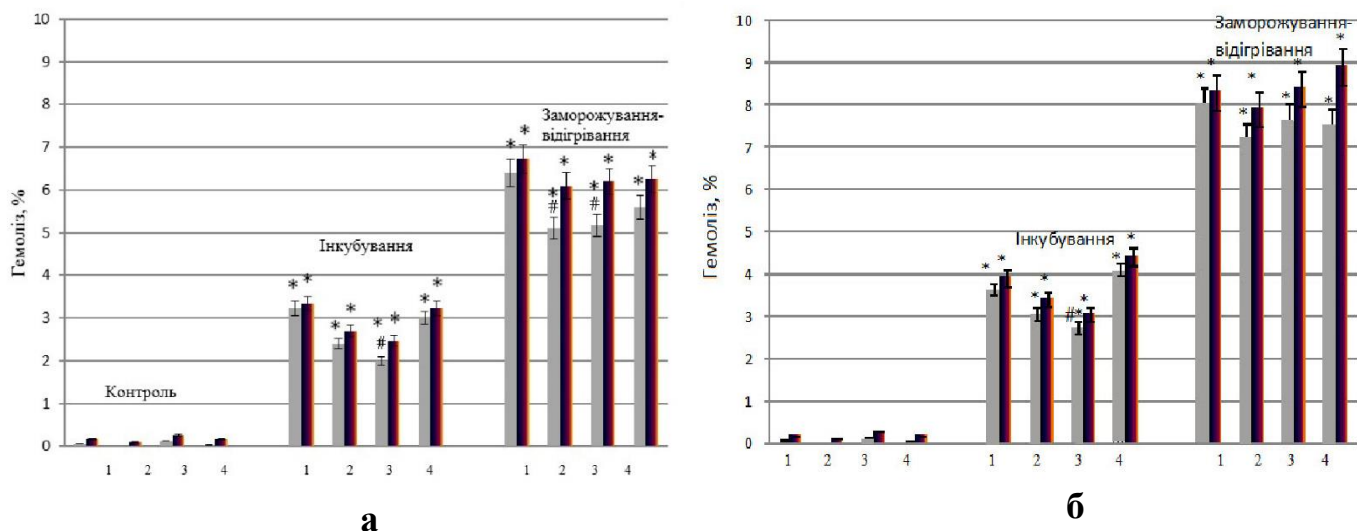


Рис. 7 Гемоліз еритроцитів людини (1), бика (2), кролика (3) і коня (4) при моделюванні трансфузії після різних етапів кріоконсервування з комбінованим середовищем (а) та розчином ДМСО (б): ■ - еритроцити, які інкубовано в плазмі; ■ - еритроцити, які інкубовано в 0,9 % NaCl (pH-7,4)

*Примітки:* \* - статистично значущі відмінності порівняно з контролем; # - статистично значущі відмінності порівняно з еритроцитами інших ссавців ( $p < 0,05$ ).

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 із тим, що їх застосування дозволяє запобігти такому фактору кріопшкодження, 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  $25 \div 30$  град. вища, ніж при використанні гліцерину і 1,2-ПД, та на  $50 \div 55$  град. вища, ніж з ДМСО.

4. Температура склування при кріоконсервуванні еритроцитів у комбінованому кріозахисному середовищі, яке містить ПЕО-1500, ДМСО, 1,2-ПД і 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  $-95^{\circ}\text{C}$ , а при використанні однокомпонентного розчину ДМСО нижче  $-125^{\circ}\text{C}$ .

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, що 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.

## ПЕРЕЛІК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Статті у фахових журналах України

1. Cryopreservation of equine and bovine erythrocytes using combined protective media / P.Yu. Ulizko, O.M. Bobrova, O.A. Nardid, P.M. Zubov, I.F. Kovalenko, V.M. Kuchkov, L.A. Vodopianova // Problems of cryobiology and cryomedicine. 2019. V. 29, № 3. P. 255-265. (Scopus) DOI: 10.15407/cryo29.03.255 (Внесок здобувача: приготування експериментальних зразків, обробка і аналіз отриманих експериментальних даних.)

2. Влияние смесей криопротекторов на сохранность криоконсервированных эритроцитов млекопитающих / П.Ю. Улизко, Г.Ф. Жегунов, Е.Н. Боброва, А.В. Зинченко // Вісник проблем біології і медицини. 2011. Т. 3, № 3. С. 26-29. (Внесок здобувача: планування експерименту, приготування зразків еритроцитів бика, коня, кролика та людини з криозахисними розчинами, криоконсервування зразків крові, моделювання трансфузії, вимірювання гемолізу спектрофотометричним методом, порівняльний аналіз отриманих даних.)

3. Фазовые переходы и стеклование в криозащитных средах и суспензиях эритроцитов лошади ниже 0°C / П.Ю. Улизко, Е.Н. Боброва, А.В. Зинченко, Г.Ф. Жегунов // Вісник проблем біології і медицини. 2011. Т. 3, № 2. С. 253-256. (Внесок здобувача: приготування криозахисних розчинів та експериментальних зразків суспензій еритроцитів ссавців, дослідження фазових переходів і склування, обробка калориметричних термограм, аналіз отриманих експериментальних даних.)

4. Улизко П.Ю., Жегунов Г.Ф., Денисова О.Н. Влияние криоконсервирования с ДМСО на сохранность и осмотическую хрупкость эритроцитов различных видов млекопитающих // Проблемы криобиологии. 2011. Т. 21, № 1. С. 52-57. (Внесок здобувача: планування експерименту, приготування зразків еритроцитів бика, коня, кролика та людини з криозахисними розчинами, криоконсервування зразків крові, моделювання трансфузії, вимірювання гемолізу спектрофотометричним методом, порівняльний аналіз отриманих даних.)

### Статті в наукових журналах інших країн

5. New cryoprotective media for cryopreservation of mammal erythrocytes / P. Ulizko, E. Bobrova, O. Nardid, L. Vodopyanova, S. Repina // Trakia Journal of Sciences. 2019. V. 17, № 4. P. 303-307. DOI: 10.15547/tjs.2019.04.001 (Внесок здобувача: планування експерименту, приготування зразків еритроцитів бика, коня, кролика та людини з криозахисними розчинами, криоконсервування зразків крові, моделювання трансфузії, вимірювання гемолізу спектрофотометричним методом, порівняльний аналіз отриманих даних.)

6. Улизко П.Ю., Боброва Е.Н., Жегунов Г.Ф. Осмотические свойства эритроцитов млекопитающих, криоконсервированных в присутствии комбинированных криозащитных сред // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. 2014. Т. 6, № 1. С. 100-107. (eLIBRARY.ru) (Внесок здобувача: планування експерименту, приготування зразків еритроцитів бика, коня, кролика та людини з криозахисними розчинами, криоконсервування зразків крові, моделювання трансфузії, вимірювання гемолізу спектрофотометричним методом, порівняльний аналіз отриманих даних.)

Статті в інших наукових журналах

7. Evaluation of efficiency of equine erythrocyte cryopreservation using fluorescent dyes / P.Y. Ulizko, O.M. Bobrova, O.A. Nardid, P.M. Zubov, Yu.S. Novorova, I.F. Kovalenko // Альманах науки. 2018. Т. 13, № 4. С. 14-17. *(Внесок здобувача: приготування експериментальних зразків, обробка і аналіз отриманих експериментальних даних.)*

Статті в збірках матеріалів конференцій

8. Cryopreservation of animals' erythrocytes / P. Ulizko, O. Bobrova, E. Nardid, I. Goriacha, M. Schetinsky // European research area: status, problems and prospects. Proceedings of the international academic congress. Section 2 Biology (Latvia, Riga, 1-2 Sep. 2016). Riga, 2016. P. 13-15. *(Внесок здобувача: 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.)*

9. Современные методы долгосрочного хранения эритроцитов сельскохозяйственных животных / П.Ю. Улизко, Е.Н. Боброва, В.Н. Кучков, Л.А. Водопьянова, Ю.С. Говорова // Актуальные проблемы зоологической науки в Беларуси. Сборник статей XI Зоологической Международной научно-практической конференции; (Беларусь, Минск, 1-3 ноября 2017). Минск: А.Н. Вараксин, 2017. Т. 1. С. 393-397. *(Внесок здобувача: 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.)*

Патенти України на корисну модель

10. Спосіб кріоконсервування еритроцитів тварин: пат. 106776 Україна, МПК G01N 24/14(2006.01) // П.Ю. Улізко, О.М. Боброва, О.А. Нардід, О.В. Зінченко, Г.Ф. Жегунов, Л.А. Водоп'янова; заявник та патентовласник ІПКіК НАН України. № u201510201, заяв. 19.10.2015, Опубл.10.05.2016. Бюл. №9.

Тези конференцій

11. Complex cryopreservation medium for mammalian erythrocytes / P. Ulizko, O. Bobrova, L. Vodopyanova, D. Mangasarov // Cryo 2020. The 57<sup>th</sup> annual meeting of the Society for cryobiology: abstracts (Virtual annual meeting, 21-23 July 2020). 2020. P. 65.

12. Ulyzko P.Yu., Bobrova O.M., Vodopyanova L.A. Influence of low-temperature phase transitions on erythrocytes integrity // Problems of cryobiology and cryomedicine. 2019. V.29, № 2. P. 179. *(Scopus)* DOI: 10.15407/cryo29.02.179

13. Применение комбинированной криозащитной среды при кріоконсервировании эритроцитов человека, быка, коня и кролика / П.Ю. Улизко, Е.Н. Боброва, О.А. Нардид, Л.А. Водопьянова, В.Н. Кучков // Стратегії інноваційного розвитку природничих дисциплін: досвід, проблеми та перспективи; (Кропивницький, 21 бер. 2019). Кропивницький, 2019. С. 141-142.

14. Ulizko P.Yu., Bobrova O.M., Vodopyanova L.A. Application of fluorescent dyes to assess the state of bovine and equine erythrocytes after cryopreservation // Problems

of cryobiology and cryomedicine. 2018. V. 28, № 2. P. 189. (*Scopus*) DOI: 10.15407/cryo28.02.189

15. Вплив 1,2-пропандіолу на конформаційну стабільність гемоглобіну бика і коня / Ю.С. Говорова, О.В. Зінченко, О.М. Боброва, О.А. Нардід, С.В. Рєпіна, П.Ю. Улізко // Біологія тварин. 2018. Т. 20, № 3. Р. 105.

16. Улізко П.Ю., Боброва О.М. Низькотемпературні фазові переходи під час кріоконсервування еритроцитів коня з використанням комбінованих кріозахисних середовищ // Проблемы криобиологии и криомедицины. 2017. Т. 27, № 2. Р. 178. (*Scopus*)

17. Улізко П.Ю., Боброва О.М. Вплив кріопротекторів і низьких температур на збереженість еритроцитів бика, коня та кролика // Проблемы криобиологии и криомедицины. 2016. Т. 26, № 2. С. 184.

18. Применение комбинированных криозащитных сред при кріоконсервировании эритроцитов млекопитающих/ П.Ю. Улизко, Е.Н. Боброва, Г.Ф. Жегунов, А.В. Зинченко // Биология – наука XXI века. 17-я Международная Пушчинская школа- конференция молодых ученых: сборник тезисов. (Россия, Пушино, 21-26 апр. 2013). Пушино, 2013. С. 157-158.

19. Дослідження кріочутливості еритроцитів тварин в умовах низькотемпературного консервування із застосуванням флуоресцентних методів / О.А. Житняковська, П.Ю. Улізко, О.А. Соколик, Т.С. Дюбко, Г.Ф. Жегунов // Молодь і поступ біології: збірник тез VI Міжнар. наук. конфер. Львів, 2010. С.9.

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

## АНОТАЦІЯ

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

Дисертація на здобуття ступеня кандидата біологічних наук 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. Встановлено, 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. Це дозволяє розширити діапазон можливих температур зберігання еритроцитів ссавців і робить середовище зручнішим для практичного застосування. 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. Розроблено комбіноване середовище (15% ПЕО-1500, 10% ДМСО, 5% 1,2-ПД і 5% сахарози), яке ефективно захищає еритроцити ссавців в процесі кріоконсервування і

гемоліз еритроцитів бика після заморожування-відігрівання становить 5,2%, кролика - 6,4%, коня - 7,2%, а людини - 5,9 %. При консервуванні еритроцитів коня, бика і кролика у комбінованому криозахисному середовищі не тільки знижуються загальні втрати клітин у порівнянні з розчином ДМСО, але й також еритроцити, які збереглися після всіх етапів криоконсервування більш близькі до контрольних.

**Ключові слова:** еритроцити ссавців, криоконсервування, комбіновані криозахисні середовища, низькотемпературні фазові переходи, гемоліз, осмотична крихкість.

## АННОТАЦИЯ

**Улизко П.Ю. Криоконсервирование эритроцитов млекопитающих с применением комбинированных криозащитных сред. - Квалификационная работа на правах рукописи.**

Диссертация на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.19 – криобиология». - Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, 2021.

Диссертационная работа посвящена разработке эффективной комбинированной криозащитной среды для криоконсервирования эритроцитов млекопитающих. Установлено, что температура стеклования в комбинированной среде снижается при увеличении концентрации ДМСО и повышается при увеличении концентрации ПЭО-1500 и при добавлении сахарозы. Температура стеклования эритроцитов в комбинированных криозащитных средах, содержащих ПЭО-1500, ДМСО, 1,2-ПД и сахарозу повышается по сравнению с температурой стеклования сред на основе ДМСО, что позволяет расширить диапазон возможных температур хранения эритроцитов млекопитающих и делает среду более удобной для практического применения. Стеклообразующая способность комбинированной среды в большей степени зависит от суммарной концентрации криопротекторов в растворе, чем от типа криопротектора. Выявлено, что применение комбинированных криозащитных сред позволяет избежать развития кристаллизации эвтектических составов, характерных при применении в составе криозащитной среды только ПЭО-1500 или ДМСО, что позволяет исключить один из факторов криоповреждений.

В работе было показано, что при консервировании эритроцитов лошади, быка и кролика в комбинированной криозащитной среде не только снижаются общие потери клеток по сравнению с раствором ДМСО, но также эритроциты, которые сохранились после всех этапов криоконсервирования близки к контрольным. Это особенно актуально для эритроцитов лошади, которые более чувствительны к повреждающим криобиологическим факторам. Установлено, что использование ДМСО в комбинированной среде при концентрации выше 10% приводит к достоверному повышению уровня гемолиза еще на этапе инкубации. Повышение концентрации ПЭО-1500 позволяет существенно снизить уровень гемолиза эритроцитов на этапе замораживания – оттаивания, однако наблюдается резкий рост уровня гемолиза на этапе удаления криопротекторов. Добавка сахарозы и 1,2-ПД в комбинированную среду позволяет достоверно уменьшить потери клеток при низкотемпературном воздействии. Разработана новая комбинированная криозащитная среда с 15% ПЭО-1500, 10% ДМСО, 5% 1,2-ПД и 5% сахарозы, которая

эффективно сохраняет эритроциты быка, лошади, кролика и человека в процессе криоконсервирования. Показано, что после замораживания в разработанной комбинированной среде гемолиз эритроцитов быка составляет 5,2%, кролика - 6,4%, лошади - 7,2%, а человека - 5,9%. После всех этапов криоконсервирования (инкубации с криозащитной средой, замораживания-оттаивания, процедуры удаления криопротекторов и переноса в изотоническую среду) уровень гемолиза эритроцитов существенно возрастает, но удается получить от 74,6% до 81,6% сохранившихся клеток в зависимости от вида млекопитающих. Показано, что после криоконсервирования в комбинированной криозащитной среде осмотические свойства деконсервированных эритроцитов млекопитающих лучше и при моделировании гемолиз их ниже, чем со средой на основе ДМСО. Выявлено, что после инкубирования с разработанной комбинированной криоконсервующей средой, около 97% деконсервированных эритроцитов быка, лошади, кролика и человека остаются сохранными после инкубации в плазме и физиологическом растворе при температуре 37°C в течение 24 часов. Даже после всех этапов криоконсервирования около 94% деконсервированных эритроцитов исследованных млекопитающих остаются сохранными после инкубации в плазме при температуре 37°C в течение 24 часов. Количество эритроцитов, погибших при моделировании трансфузии в течение 24 часов, после инкубации с ДМСО и после всех этапов криоконсервирования с ним достоверно больше, чем с комбинированной криозащитной средой.

**Ключевые слова:** эритроциты млекопитающих, криоконсервирование, комбинированные криозащитные среды, низкотемпературные фазовые переходы, гемолиз, осмотическая хрупкость.

## ANNOTATION

**Ulizko P.Yu. Cryopreservation of mammalian erythrocytes with the use of combined cryoprotective media. - The qualifying scientific paper as a manuscript.**

Thesis for the degree of Candidate of Biological Science in specialty 03.00.19 "Cryobiology". – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2021.

The dissertation is devoted to the development of an effective combined cryoprotective environment for cryopreservation of mammalian erythrocytes. It was found that the glass transition temperature of erythrocytes in combined cryoprotective media containing PEO-1500, DMSO, 1,2-PD and sucrose increases in comparison with the glass transition temperature of DMSO-based media. This allows to expand the range of possible storage temperatures of mammalian erythrocytes and makes the medium more convenient for practice. It was shown that the use of combined cryoprotective media avoided the development of crystallization of eutectic compositions, characteristic when using only PEO-1500 or DMSO as a part of cryoprotective medium, that eliminates one of the factors of cryodamage. A combined medium (15% PEO-1500, 10% DMSO, 5% 1,2-PD and 5% sucrose) has been developed, which effectively preserves mammalian erythrocytes during cryopreservation and the hemolysis of erythrocytes after freezing-warming was as follows: 5.2% for bovine ones, 6.4% for rabbit, 7.2% for equine, and 5.9% for human. Preservation of bovine, equine and rabbit erythrocytes in the combined cryoprotective medium not only

reduces the total cell loss compared to DMSO solution, but also erythrocytes, which survived after all stages of cryopreservation, were closer to the control.

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

### ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ДСК – диференційна скануюча калориметрія; 1,2-ПД – 1,2-пропандіол; ПЕО–1500– поліетиленоксид з молекулярною масою 1500; ДМСО – диметилсульфоксид.

Відповідальний за випуск – д.б.н. Г.О. Бабійчук

Підписано до друку 02.03.2021  
Формат 60 x 84 1/16. Папір офсетний. Гарнітура Times New Roman.  
Друк ксерографічний. Ум. друк. арк. 0,9.  
Наклад 100 прим. Зам.№ 151-21.  
Надруковано з макету замовника у ФОП Бровін О.В.,  
61022, м. Харків, вул. Трінклера 2, корп. 1, к.19.