

## Низькотемпературні фазові переходи під час кріоконсервування еритроцитів коня з використанням комбінованих кріозахисних середовищ

П.Ю. Улізко<sup>2</sup>, О.М. Боброва<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

<sup>2</sup>Харківська державна зооветеринарна Академія, м. Харків

## Low Temperature Phase Transitions During Cryopreservation of Horse Red Blood Cells Using Combined Cryoprotective Media

P.Yu. Ulizko<sup>2</sup>, O.M. Bobrova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

<sup>2</sup>Kharkiv State Zooveterinary Academy, Kharkiv, Ukraine

Кріоконсервування – сучасний метод довготривалого зберігання еритроцитів тварин. Фазовий перехід вода-лід при охолодженні суспензії клітин призводить до пошкодження біологічних структур як кристалами льоду, так і внаслідок гіперконцентрації солей. Основною стратегією запобігання кріопшкодження біологічних об'єктів є використання кріозахисних середовищ, які сприяють зменшенню розміру кристалів льоду або їх появі у охолоджуваному зразку.

Мета даної роботи – аналіз фазових переходів і склування у суспензіях еритроцитів крові коня при кріоконсервуванні в присутності комбінованих кріозахисних середовищ.

Відмиту еритромасу крові коня змішували з кріоконсервантом у об'ємному співвідношенні 1:1 та інкубували за кімнатної температури протягом 15 хв. Досліджували кріозахисні середовища містили 1,2-пропандіол (1,2-ПД), диметилсульфоксид (ДМСО), поліетиленоксид із м. м. 1500 (ПЕО-1500) і сахарозу у різних співвідношеннях. ПЕО-1500 брали в концентрації 2,5–10 %, ДМСО – 5–7,5 %, 1,2-ПД – 2,5–5 %, сахарозу – 2,5–5 %. Зразки охолоджували шляхом занурення в рідкий азот. Термограми реєстрували на етапі нагріву зі швидкістю 0,5 град/хв за допомогою диференційного скануючого калориметра, який розроблено в ІПК і К НАН України.

Показано, що при використанні комбінованих кріозахисних середовищ не розвивається кристалізація евтектичних сумішей як під час охолодження водних розчинів ПЕО-1500 або ДМСО. Це дозволяє виключити один із факторів кріопшкодження. Температура склування суспензії еритроцитів у комбінованих кріозахисних середовищах, які містять суміші ПЕО-1500, ДМСО, 1,2-ПД і сахарозу, підвищується порівняно з температурою склування середовищ на основі ДМСО. Кріоконсервування у комбінованих кріозахисних середовищах дозволяє підвищити мінімальну рекомендовану температуру зберігання еритроцитів коня і, відповідно, зменшити згубний вплив температурних коливань у кріобанках.

Таким чином, у комбінованих кріозахисних середовищах не розвиваються процеси кристалізації і плавлення евтектичних складів, а температура склування істотно вища у порівнянні з середовищами на основі ДМСО, до складу яких не входять високомолекулярні компоненти. Поєднання у кріозахисному середовищі низько- та високомолекулярних компонентів є перспективним для практичного застосування.

Cryopreservation is a conventional method for long-term storage of animal red blood cells. The water-ice phase transition during cell suspension cooling results in damaging biological structures due to both ice crystal formation and hyperconcentrating of salts. The main strategy in preventing cryoinjuries of biological objects is the use of cryoprotective media, promoting the ice crystal size reduction or preventing their appearance in a cooled sample.

This research aim was to analyse the phase transitions and vitrification in horse blood red blood cell suspensions during cryopreservation in the presence of combined cryoprotective media.

The washed horse blood erythrocyte mass was mixed with a cryoprotective in 1:1 v/v ratio and incubated at room temperature for 15 min. The studied cryoprotective media contained 1,2-propanediol (1,2-PD), dimethyl sulfoxide (DMSO), polyethylene oxide with MW 1500 (PEO-1500) and sucrose in different ratios. The concentrations of PEO-1500, DMSO, 1,2-PD and sucrose were as follows: 2.5–10%, 5–7.5%, 2.5–5% and 2.5–5%, respectively. Samples were cooled by immersion into liquid nitrogen. Thermograms were recorded during heating with the rate of 0.5 deg/min using differential scanning calorimeter designed at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine.

The use of combined cryoprotective media allowed to prevent crystallization of eutectic mixtures, unlike the case of cooling PEO-1500 or DMSO aqueous solutions. This allowed to exclude one of the cryoinjury factors. The glass transition temperature of red blood cell suspension in combined cryoprotective media, containing mixed PEO-1500, DMSO, 1,2-PD and sucrose, increased as compared to that in DMSO-based media. The cryopreservation of combined cryoprotective media enables increasing the minimum recommended temperature of storage for horse red blood cells and thereby reducing a harmful effect of temperature fluctuations in cryobanks.

Thus, combined cryoprotective media allowed to exclude crystallization and melting processes of eutectic compositions, and significantly increase the glass transition temperature as compared to DMSO-based media, free of high-molecular-weight components. The combination of low- and high molecular weight components in cryoprotective medium is promising for practical application.

