



**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ДЕРЖАВНИЙ БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ  
УНІВЕРСИТЕТ**

**Факультет ветеринарної медицини  
Кафедра фізіології та біохімії тварин**

**О.М. Денисова, Г.Ф. Жегунов, О.А. Нардід, Н.І. Гладка**

# **ШВИДКІСТЬ ТА ГЛИБИНА ЗАМОРОЖУВАННЯ БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ**

**Навчально-методичний посібник**

**Харків  
2024**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ДЕРЖАВНИЙ БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
Факультет ветеринарної медицини  
Кафедра фізіології та біохімії тварин

О.М. Денисова, Г.Ф. Жегунов, О.А. Нардід, Н.І. Гладка

## **ШВИДКІСТЬ ТА ГЛИБИНА ЗАМОРОЖУВАННЯ БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ**

### **Навчально-методичний посібник**

для здобувачів другого (магістерського) рівня вищої освіти  
денної форми навчання зі спеціальностей 211 Ветеринарна медицина та  
162 Біотехнології та біоінженерія

Затверджено  
Рішенням Науково-  
методичної комісії факультету  
ветеринарної медицини ДБТУ  
Протокол № 4  
від 25 червня 2024 р.

Харків  
2024

УДК 57.086.13(07)  
Д-78

Схвалено на засіданні  
кафедри фізіології та біохімії тварин ДБТУ  
Протокол № 15 від 18.04.2024 р.

**Рецензенти:**

**Щербак О. В.** - к. с.-г. н., декан факультету біотехнологій, професор кафедри біотехнології, молекулярної біології та водних біоресурсів Державного біотехнологічного університету

**Куц М.М.** - д.вет.н., професор кафедри нормальної і патологічної морфології Державного біотехнологічного університету.

**Денисова О.М.**

Д-78 Швидкість та глибина заморожування біологічних об'єктів [Текст]: навч.-метод. посіб. для здобувачів другого (магістерського) рівня вищої освіти зі спеціальностей 211 Ветеринарна медицина та 162 Біотехнології та біоінженерія / О.М. Денисова, Г.Ф. Жегунов, О.А. Нардід, Н.І. Гладка ; Держ. біотехн. ун-т. – Харків, 2024.– 29 с.

Навчально-методичний посібник призначений для самостійної роботи студентів зі спеціальностей «Ветеринарна медицина» і «Біотехнології та біоінженерія» з дисциплін «Кріоветеринарія», «Основи низькотемпературної ветеринарної медицини», «Кріобіологія і кріомедицина». У посібнику докладно описуються причини, механізми та наслідки пошкодження клітин холодом при повільному та швидкому режимах заморожування біооб'єктів.

УДК 57.086.13(07)

**Відповідальний за випуск О. М. Денисова, канд. біол. наук.**

© Денисова О. М., Жегунов Г.Ф., Нардід О.А.,  
Гладка Н. І. 2024  
© ДБТУ, 2024

## ЗМІСТ

1. ОСНОВНІ ШВИДКІСНІ РЕЖИМИ ЗАМОРОЖУВАННЯ	5
1.2. Повільне заморожування	5
1.2.1. Технічне здійснення заморожування	6
1.2.2. Температурний аналіз процесу заморожування у часі	7
1.2.3. Евтектика	8
1.2.4. Модифікація евтектики кріопротекторами	10
1.3. Швидке заморожування	10
1.4. Оптимальна швидкість охолодження	12
1.5. Багатоетапне заморожування	13
1.6. Надшвидке заморожування	16
1.6.1. Вітрифікація (склування)	16
2. ВІДІГРІВ	16
3. ОСОБЛИВОСТІ ГЛИБИНИ ЗАМОРОЖУВАННЯ	19
4. ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ЗАМОРОЖУВАННЯ ТА КРІОКОНСЕРВАЦІЇ	22
УЗАГАЛЬНЕННЯ	25
КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ	27
ЛІТЕРАТУРА	29

## 1. ОСНОВНІ ШВИДКІСНІ РЕЖИМИ ЗАМОРОЖУВАННЯ

Одним із головних факторів, що визначають, чи виживе біооб'єкт після заморожування, є швидкість охолодження.

Залежно від швидкості охолодження методи заморожування умовно поділяються на:

1. Методи повільного заморожування – швидкість зниження температури біооб'єктів 1 – 10 град/хв;
2. Методи швидкого заморожування – швидкість зниження температури 10 – 5000 град/хв;
3. Методи надшвидкого заморожування, у яких забезпечується вітрифікація – швидкість зниження температури 5000 – 10000 і більше град/хв.
4. Багатоетапне заморожування.

Біологічні об'єкти дуже різні, тому вибір режимів охолодження залежить від низки умов:

- а) від об'єму, форми та розмірів консервованого об'єкта;
- б) від організації об'єкта: суспензія клітин, тканина чи орган;
- в) від типу та видової приналежності клітин (тканин);
- г) від виду та концентрації кріопротекторів;
- д) від форми, об'єму та матеріалу контейнера, в якому заморожують об'єкт.

Тобто, кожен об'єкт вимагає індивідуального підходу при кріоконсервуванні. Це стосується і швидкості заморожування, яка має бути оптимальною для будь-якого біологічного об'єкта.

### 1.2. Повільне заморожування

При повільному заморожуванні (1 – 10 град/хв) до температури точки замерзання води, з клітинами (в суспензії) протягом кількох хвилин практично нічого поганого не відбувається. Тільки після початку кристалізації води у зовнішньому середовищі починають діяти фактори, що призводять до кріопошкоджень. У міру збільшення зовнішніх кристалів клітини швидко втрачають воду через оболонку, що обумовлено осмосом. До якоїсь стадії заморожування затверділа фаза містить в основному воду, що закристалізувалась. Незамерзлою залишається концентрована в мікроканалах між кристалічними фазами рідка маса речовин (наприклад, цукри, солі, кріопротектори та ін.) разом з витісненими туди клітинами. Об'єм незамерзлої фракції поступово зменшується, а концентрація речовин та

клітин збільшується. При цьому ще сильніше збільшується осмотична сила довкілля, що призводить до подальшої прогресуючої дегідратації клітин. Клітини можуть зменшитися в об'ємі у кілька разів. Крім цього, вони піддаються здавлюванню кристалами, що ростуть. На певному етапі заморожування у клітинах ініціюється утворення дрібного внутрішньоклітинного льоду, що ушкоджує внутрішню структуру та організацію.

Як було сказано раніше, перехід води з рідкого в твердий стан при зниженні температури відбувається до тих пір, поки концентрації розчинених речовин в рідкій фазі, що залишилася, не досягнуть деяких певних величин, при яких весь розчин, який залишився, твердне в суцільну масу. Вона складається з прошарків льоду, розчиненої речовини та кристалогідратів цієї речовини.

В результаті заморожений об'єкт перетворюється на гетерогенне тверде тіло, що складається з кількох фаз:

- а) великих кристалів замерзлої води зовнішнього середовища;
- б) застиглої маси, яка складається з суміші твердих гіперконцентрованих речовин, що називається *евтектикою*;
- в) вмерзлих в евтектику клітин з дрібними кристалами всередині.

Таким чином, пошкодження клітин у процесі повільного заморожування-обігріву клітинної суспензії обумовлено: а) утворенням позаклітинних та внутрішньоклітинних кристалів льоду, б) механічним здавлюванням, в) зневодненням, г) так званім «ефектом концентрованого розчину».

Імовірність та ступінь ушкодження клітин факторами кріоконсервації зростає зі збільшенням тривалості їх дії.

### **1.2.1. Технічне здійснення заморожування**

Лінійні режими повільного охолодження реалізуються за допомогою *програмних заморожувачів*. Для конвекційного відбору тепла від зразків зазвичай використовують холодні (до мінус 150°C) пари рідкого азоту, випаровування яких контролюється поміщенням у посудину Дьюара терморезистором, а зміна температури здійснюється нагріванням у теплообміннику. Регулювання температури зразка або температури в камері заморожувача здійснюють за принципом негативного зворотного зв'язку шляхом її порівняння з температурою (сигналом) пристрою, що задає режим охолодження.

Програмні заморожувачі використовують для заморожування клітинних суспензій у контейнерах об'ємом до 1л. За різних габаритів товщина контейнерів зазвичай не перевищує 1см. Матеріалом контейнерів

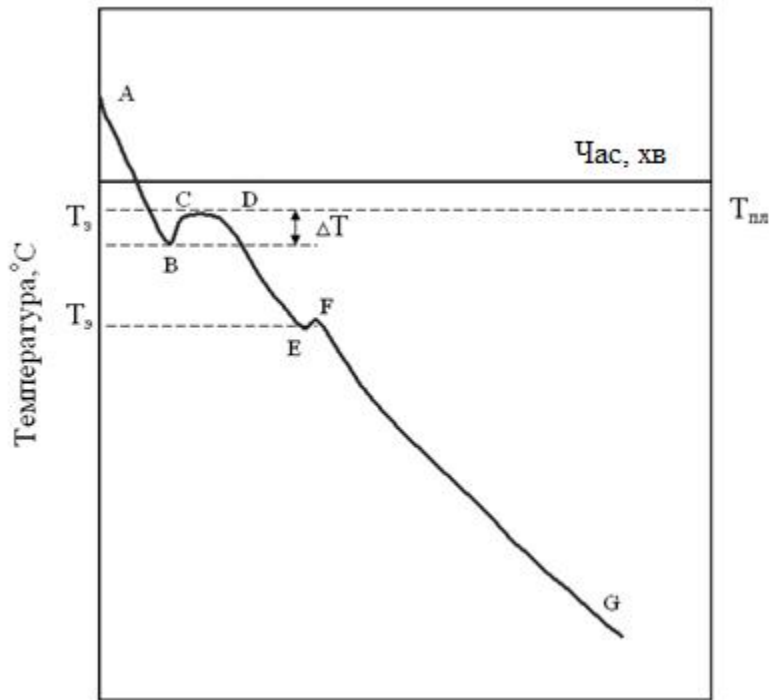
можуть бути як різні полімерні матеріали, так і метал (харчовий алюміній, нержавіюча сталь).

Швидкості охолодження, що реалізуються за допомогою програмних заморозувачів, зазвичай не перевищують 10 град/хв. Охолодження проводиться до температур не нижче мінус 70°C, потім контейнери з об'єктом поміщають у рідкий азот.

Необхідною умовою рівноважної кристалізації є дуже повільне охолодження та внесення в розчин кристалічної «затравки утворення льоду» для запобігання переохолодженню.

### 1.2.2. Температурний аналіз процесу заморожування у часі

*Температурний аналіз процесів повільного заморожування-відтавання* простих сольових розчинів дозволяє, перш за все, охарактеризувати процеси, що відбуваються в системах, що заморожуються, в різних температурних зонах. На рис. 1 представлена типова термограма розчину, що заморожується.



**Рис. 1. Типова термограма розчину, що заморожується:** *A* – початок охолодження; *B* – початок кристалізації; *C* – початок виділення прихованої теплоти кристалізації; *D* – закінчення виділення прихованої теплоти кристалізації; *E* – початок затвердіння евтектики; *F* – кінець затвердіння евтектики; *G* – закінчення заморожування,  $T_3$  температура замерзання;  $T_n$  –

*температура плавлення;  $T_e$  – температура евтектики;  $\Delta T$  – початкове переохолодження системи.*

При охолодженні розчину ділянка АВ термограми відповідає охолодженню розчину до стадії початку кристалізації. На цій ділянці не відбувається видимих змін ні в охолоджуваному розчині, ні в біологічному об'єкті, що охолоджується. Ділянка термограми ВС є «температурний стрибок» початку кристалізації. На цій ділянці починають утворюватися перші кристали льоду. Майже горизонтальна площадка CD на термограмі виникає внаслідок виділення в кристалізації, що триває, прихованої теплоти кристалізації на рухомій межі розділу фаз «лід – рідкий розчин». Збереження постійної температури на термограмі протягом деякого часу пов'язане із виділенням прихованої теплоти кристалізації у процесі кристалізації. Довжина цієї ділянки залежить від об'єму зразка та розташування термодатчика. Чим ближче датчик температури розташований до стінки контейнера, через яку здійснюється тепловідведення від зразка, тим коротше виявляється горизонтальний майданчик CD, тому що фронт кристалізації швидше досягає точки, в якій розташований датчик температури. У кінцевому випадку, коли розмір датчика температури можна порівняти з характерним розміром об'єкта, горизонтальна ділянка на термограмі перетворюється на злам.

Злам на ділянці EF термограми обумовлений виділенням тепла при твердінні областей, у яких концентрація компонентів розчину відповідає евтектичній. Чим вище вихідна концентрація компонентів розчину, що охолоджується, тим більший його об'єм твердне в евтектичній точці і тим довшою стає ділянка термограми при евтектичній температурі  $T_e$ . Рекристалізація – зростання великих кристалів за рахунок дрібних при заморожуванні або відігріванні – термічними ефектами не супроводжується.

### **1.2.3. Евтектика**

Біологічні об'єкти складаються переважно з води. Вода живих тканин є складовою біологічної рідини, де, поруч із водою, перебувають і інші молекули. Якщо тканина охолоджується до температури заморожування, молекули води починають з'єднуватися і утворюють кристали льоду, що ростуть. Лід відсуває інші молекули назовні кристала, що росте, де вони збираються в хімічно більш активний концентрований розчин. У міру утворення льоду кількість рідкої фази води зменшується, і концентрація розчину, що заморожується, збільшується. Тому температура його замерзання знижується. Утворення льоду при зниженні температури відбувається до тих пір, поки концентрація деяких розчинів не досягне деякої



певної для даної розчиненої речовини величини, при якій весь розчин застигає в суцільну масу, що складається з тонких прошарків льоду і розчиненої речовини у твердому вигляді. Така застигла маса називається **евтектикою** і складається із суміші твердих речовин. Інтервал температур, в якому тверді компоненти, що виділяються із замороженої системи, знаходяться в рівновазі з рідкою фазою, називається **евтектичною зоною**. *Ця зона є найбільш пошкоджуючою для біологічних об'єктів, оскільки на них одночасно діють: солі, температура та лід.* Температура, коли відбувається утворення тотальної твердої маси, називається **евтектичною температурою**. Ця температура є температурою повного затвердіння біооб'єкта та зовнішнього середовища. Після повного зникнення рідкої фази подальше охолодження спричиняє стрімке падіння температури системи.

Найбільш низькі евтектичні температури можуть бути у розчинів електролітів, що мають високу розчинність.

**Таблиця 1. Евтектичні температури для розчинів електролітів**

Природа електролітів	Евтектична температура, °С
KNO <sub>3</sub>	-2,0
NaNO <sub>3</sub>	-8,15
KCl	-11,1
KBr	-13,0
NH <sub>4</sub> Cl	-15,8
NaCl	-21,8
MgCl <sub>2</sub>	-33,6
CaCl <sub>2</sub>	-54,9

З представленої таблиці 1 видно, що найнижчу температуру замерзання евтектики мають розчини солей двовалентних іонів кальцію та магнію.

Евтектична кристалізація розчинів значною мірою гальмується додаванням кріопротекторів, наприклад, гліцерину, ДМСО, 1,2-пропандіолу, ПЕГ, ГЕК, які здатні зв'язати воду і тим самим знижувати точку евтектики. Більшість кріопротекторів (гліцерин, ДМСО, 1,2-пропандіол, ПЕГ, ГЕК, диметилформамід) мають низькі температури евтектики (46 - 1000С). Солі при цьому залишаються у водному розчині у вигляді складного комплексу і при подальшому зниженні температури тверднуть у суцільну масу.

Вплив солей та механічна дія зростаючих кристалів льоду на клітини в суспензіях зменшується із збільшенням концентрації кріопротекторів у них. В області концентрацій вище 0,1 М клітини практично не відсуваються

льодом, що росте, у той час як в сольових розчинах цей процес відбувається зі швидкістю кілька мікрометрів в секунду. Зокрема, додавання ГЛ у концентрації понад 10% (1.1M) до ізотонічного розчину хлористого натрію, що містить еритроцити, призводить до практично повного зникнення механічної взаємодії між клітинами та льодом. Зменшується також і ефект солей.

#### **1.2.4. Модифікація евтектики кріопротекторами**

Як кристалізація води, так і евтектична кристалізація починаються після переохолодження розчину. Якщо у чистій воді фазовий перехід «вода-лід» протікає і завершується при 0°C, то у водних розчинах різних речовин він може захоплювати досить широкий температурний діапазон. При цьому, якщо охолодження проводити нескінченно повільно, система «лід – концентрований заморожуванням розчин» проходитиме через ряд рівноважних станів, що описуються фазовою діаграмою. Іншими словами, кожній температурі буде відповідати певна концентрація розчину.

У сольовому розчині при досягненні евтектичної концентрації відбувається випадання з розчину кристалів солі та льоду. Евтектична концентрація хлористого натрію – 23% (4.61M), а хлористого кальцію – 30% (3.46M). Природно, що вище буде вихідна концентрація солі, тим більше евтектичної суміші утворюється. Саме тому на термограмах заморожування розчинів із високою вихідною концентрацією солі відзначається чітко виражене виділення тепла евтектичної кристалізації.

У простих розчинах кріопротекторів суміші «кріопротектор – вода» при заморожуванні склюються за певних негативних температур значно нижче нуля, залежно від його концентрації. Наприклад, при 40% (4.77M) концентрації гліцерину затвердіння водного розчину відбувається за мінус 20°C, а при 60% (7.51M) - при мінус 60°C. Тобто, певні концентрації кріопротекторів дозволяють при повільному охолодженні пройти зону евтектики без її затвердіння, що запобігає згубній дії концентрованих солей на біологічні об'єкти. Іншими словами, кріопротектор не тільки зменшує кількість льоду, що утворюється, але і може запобігти евтектичну кристалізацію солей, якщо вони не представлені занадто високою вихідною концентрацією.

### **1.3. Швидке заморожування**

Швидке заморожування здійснюється зазвичай зануренням контейнерів з біооб'єктом у рідкий азот. Залежно від розмірів, природи об'єктів, а також

контейнерів, що використовуються, швидкості їх заморожування можуть становити від 10 до 5000 град/хв. Кріопошкодження клітин при швидкому заморожуванні зумовлені двома факторами: по-перше, формуванням та зростанням внутрішньоклітинних та зовнішніх кристалів льоду та, по-друге, процесами рекристалізації. Тобто в даному випадку відсутнє зневоднення, переміщення клітин фронтом кристалів льоду, що ростуть, і відсутній ефект концентрованих солей евтектики.

У разі швидкого заморожування клітини не встигають зневоднитися, через що створюються умови для кристалізації внутрішньоклітинного розчину. Виникнення та зростання внутрішньоклітинних кристалів є летальними факторами для клітин. Внутрішньоклітинна кристалізація є безпосередньою причиною кріопошкоджень, а не наслідком впливу інших факторів пошкодження. При цьому зростання позаклітинних та внутрішньоклітинних кристалів відбувається швидко, клітина не встигає зневоднитися і застигає як єдине ціле. Імовірність швидкого формування льоду всередині клітини збільшується зі збільшенням швидкості заморожування.

При швидкому заморожуванні спостерігається феномен механічного роздавлювання клітин зростаючими кристалами позаклітинного льоду. Механічне пошкодження клітин відбувається також під час рекристалізаційного укрупнення внутрішньоклітинних кристалів під час відігрівання. Тому при швидкому відігріві збереження багатьох видів попередньо заморожених клітин вище, ніж при повільному, оскільки знижується час перебування в зоні рекристалізації. Зазначена закономірність пояснюється тим, що руйнування клітин обумовлено механічним ушкодженням у процесі рекристалізації внутрішньоклітинних кристалів при невеликих швидкостях відігріву. У цьому випадку для попередньої дегідратації та зменшення кількості внутрішніх кристалів перед заморожуванням використовують кріопротектори, що не проникають у клітини (наприклад, ПЕО-400, ПЕО-1500, ПВП, ГЕК та ін.). Дегідратація сприяє зменшенню ушкоджуючої дії внутрішньоклітинного кристалоутворення. Попередня інкубація біоб'єктів з проникаючими кріопротекторами, наприклад, ГЛ або ДМСО, також сприяє захисту клітин при швидкому заморожуванні. Але вони роблять це завдяки заміщенню частини внутрішньоклітинної води та, як наслідок, зменшення кількості внутрішньоклітинного льоду.

Таким чином, при швидкому заморожуванні факторами пошкодження, головним чином, є формування та зростання внутрішньоклітинних та зовнішніх кристалів льоду та процеси рекристалізації.

Перевагою швидкого заморожування, порівняно з повільним, є:

- а) відсутність зневоднення клітин;
- б) відсутність переміщень клітин фронтом зростаючих кристалів льоду;
- в) відсутність несприятливої дії концентрованих солей евтектики.

#### 1.4. Оптимальна швидкість охолодження

Необхідність підбору оптимальної швидкості охолодження для різних біооб'єктів обґрунтовується двофакторною теорією кріопошкодження, згідно з якою на збереження клітин у процесі кристалізації клітинної суспензії впливають два типи факторів пошкодження.

Перший тип кріопошкоджень виникає в результаті *кристалізації позаклітинного середовища* і викликає зневоднення клітин, підвищення концентрації та іонної сили поза- та внутрішньоклітинних розчинів за рахунок перетворення частини розчинника на лід. При збільшенні швидкості охолодження ступінь ушкоджень першого типу зменшується внаслідок скорочення часу дії факторів пошкодження.

Інший тип кріопошкоджень клітин обумовлений утворенням внутрішньоклітинних кристалів льоду, яке, крім зневоднення, викликає також механічне руйнування мембранних структур, особливо в процесі рекристалізації внутрішньоклітинних кристалів при повільному відігріванні суспензії. Внутрішньоклітинна кристалізація, ймовірність якої зростає при високих швидкостях охолодження, вважається максимально згубною для клітин. Тобто під час охолодження біооб'єктів відбувається два найбільш значущі кінетичні процеси – зростання кристалів льоду та дегідратація клітин. Вони відбуваються як при повільному, так і швидкому заморожуванні. Але при повільному охолодженні з постійною швидкістю осмотична рівновага в клітинах частково зберігається за допомогою дегідратації, в результаті позаклітинних кристалів льоду, що утворюються. При швидкому охолодженні внутрішньоклітинні кристали льоду формуються швидше, ніж відбувається дегідратація зовнішнім льодом. Тому в цьому випадку осмотична рівновага на плазматичній мембрані клітин порушується значно. Очевидно, що клітини пошкоджуються як при швидкому, так і при повільному заморожуванні, але оптимальна швидкість охолодження збільшує ймовірність виживання клітин.

Таким чином, оптимальна швидкість охолодження може бути визначена як найбільш щадна швидкість, при якій відбувається помірна дегідратація біооб'єктів, достатня, щоб запобігти внутрішньоклітинному кристалоутворенню.

Застосуванням кріопротекторів можна регулювати процеси дегідратації та кристалізації. У разі попередньої інкубації з *непроникаючими*

*кріопротекторами* дегідратація передує заморожуванню, що може дозволити здійснити неконтрольоване швидке заморожування. При попередньому використанні *проникаючих кріопротекторів* дегідратації клітин немає, але внутрішньоклітинний розчин знижує температуру і картину кристалізації. У тому випадку, коли внутрішньоклітинний розчин після зневоднення непроникаючими кріопротекторами зберігає здатність до кристалізації, застосовують інший прийом: дегідратація здійснюється сумішшю проникаючого та непроникаючого кріопротектора.

Отже, можна відзначити наступні закономірності:

- З проникаючими в клітини кріопротекторами можна успішніше застосовувати не тільки швидкі, але й повільні режими заморожування.
- З непроникаючими кріопротекторами краще застосовувати повільні режими заморожування.
- Комбінація проникаючих та непроникаючих кріопротекторів дозволяє підібрати індивідуальну оптимальну швидкість заморожування.

Залежно від розмірів клітини, її поверхнево-об'ємного співвідношення, коефіцієнта проникності плазматичної мембрани для води та його температурної залежності швидкість дегідратації та кристалізації клітин буде різною. Наприклад, клітини великих розмірів з малим поверхнево-об'ємним співвідношенням та уповільненим транспортом молекул води встигають зневоднюватися лише під час повільного охолодження. Отже, різні клітини та тканини вимагають різну швидкість охолодження. Так, для ооцитів ссавців з розміром  $\sim 70$  мкм оптимальними вважають швидкості охолодження  $0,1-0,3$  град/хв, для лімфоцитів з діаметром близько  $10$  мкм –  $1$  град/хв, а для еритроцитів людини, що мають форму дисків з діаметром  $8$  мкм та товщиною  $\sim 2$  мкм і характеризуються високою проникністю для води –  $5000$  град/хв.

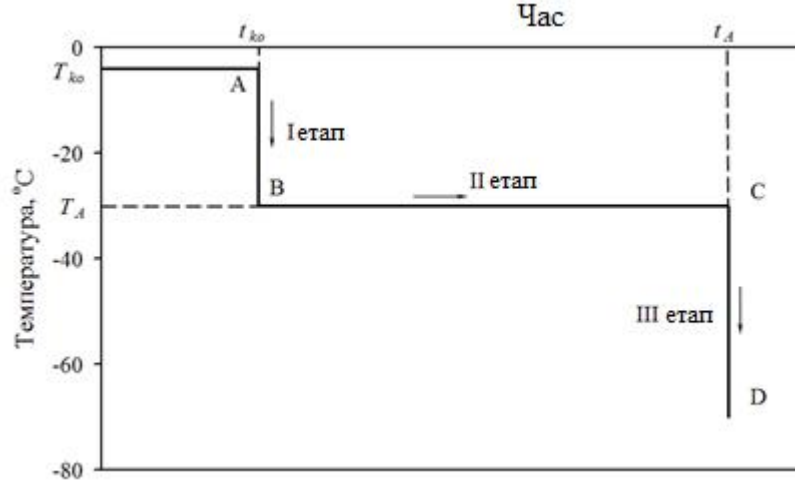
### **1.5. Багатоетапне заморожування**

Для кріоконсервування клітинних суспензій застосовуються і звані багатоступінчасті програми заморожування (Рис. 2). Ці програми заморожування складаються з кількох етапів:

1) повільне охолодження біоб'єктів від температури, за якої починається позаклітинне льодоутворення ( $0^{\circ}\text{C}$ ), до евтектичної температури позаклітинного розчину (приблизно мінус  $15 - 25^{\circ}\text{C}$ ). Цей процес здійснюють у парах рідкого азоту або в холодильнику;

2) ізотермічна експозиція клітин за цієї температури протягом 5–30 хвилин;

3) швидке заморожування об'єкта до температури рідкого азоту шляхом безпосереднього занурення у рідкий азот.



**Рис. 2. Термограма ідеалізованого двоступінчастого режиму заморожування:** I етап – повільне заморожування до температури евтектики, II етап – ізотермічна експозиція, III етап – швидке заморожування.  $T_{к0}$  – температура початку позаклітинного льодоутворення;  $T_A$  – температура адаптації;  $t_{к0}$  час початку позаклітинного льодоутворення;  $t_A$  – час закінчення адаптації.

Хоча за такого режиму заморожування внутрішньоклітинні кристали можуть зароджуватися уже протягом першого етапу, але розміри цих кристалів і кількість льоду ще досягають критичного (летального для клітини) значення. Внутрішньоклітинні кристали, що утворилися на першому етапі охолодження, не пошкоджують клітину, але є потенційно небезпечними для неї. Більш глибоке охолодження на першому етапі за відсутності температурної зупинки призвело б до подальшого збільшення розмірів внутрішньоклітинних кристалів а, отже, і до загибелі клітини.

Температурна зупинка тягне за собою якісну зміну процесу дифузійного обміну води між клітинами та рідкою фазою, що оточує їх. Виниклі при заморожуванні на першому етапі охолодження внутрішньоклітинні кристали рекристалізуються значно швидше, ніж перерозподіляється розчинник між клітиною та оточуючим середовищем.

Таким чином, поряд з оптимальним лінійним режимом охолодження існує не менш ефективний багатоступінчастий режим охолодження, який також забезпечує високу збереженість клітин.

Як правило, режим багатоступінчастого охолодження практично можна здійснити, занурюючи контейнер з клітинною суспензією в заздалегідь охолоджену до певної температури рідину, а потім переносять у рідкий азот.

Двоступінчастий режим заморожування має перевагу порівняно з режимами, за яких швидкість охолодження не змінюється. Зокрема, при двоступінчастому режимі охолодження час контакту клітин з навколишнім гіпертонічним розчином зменшується. Тому клітини при розморожуванні меншою мірою піддаються постгіпертонічному лізису, ніж клітини, заморожені з повільною постійною швидкістю. Причому процедура реалізації двоступеневого заморожування суттєво простіше, ніж заморожування з постійною швидкістю.

## **1.6. Надшвидке заморожування**

Швидкості охолодження при надшвидкому заморожуванні лежать у діапазоні від 5000 до 10000 град/хв. Експериментальні основи заморожування з такими швидкостями були закладені свого часу фізхіміком Г. Тамманом та кріобіологом Б. Люйє, які досліджували процеси кристалізації при надшвидкому заморожуванні різних органічних речовин та клітин у тонкому шарі. За таких умов заморожування затвердіння розчинів йде дуже швидко в єдину аморфну масу. Пізніше була вивчена можливість заморожування клітин за допомогою надшвидкого охолодження, що здійснюється, наприклад, диспергуванням дрібних крапель клітинної суспензії безпосередньо в рідкий азот, розпиленням на сильно охолоджену металеву пластину і т. п. Надшвидке охолодження може забезпечуватися також використанням спеціальних контейнерів, наприклад, діаметром 0,5÷2 мм та пакетів з тонкої фольги.

Надшвидкі швидкості заморожування уникають кристалізації і призводять до гомогенного застигання позаклітинного та внутрішньоклітинного вмісту в однорідну тверду масу. Відбувається *вітрифікація біологічних об'єктів*.

### **1.6.1. Вітрифікація (склування)**

*Вітрифікація* - це фізико-хімічний процес затвердіння розчинів без утворення кристалів льоду (склоподібно-аморфний стан), що спостерігається при високих швидкостях охолодження. Тобто вітрифікація – процес переходу рідини у твердий аморфний стан при надшвидкому заморожуванні ( $10^6 - 10^{10}$  град/с). Однак досягнення таких швидкостей охолодження навіть стосовно малих об'ємів біологічних об'єктів досить проблематично, а стосовно великих – практично неможливо.

Вітрифікації можна досягти і за більш повільного охолодження, але за умови додавання високих концентрацій кріопротекторів, що може запобігти об'єднанню молекул води в кристали і, відповідно, запобігти утворенню льоду. При цьому чим більше концентрація кріопротектора, тим менша швидкість охолодження потрібна для вітрифікації і навпаки. Однак стабільність вітрифікованого стану біоб'єктів досить невисока, що створює небезпеку прояву кристалізаційних процесів на етапі відігріву. Відносно стабільним "склом" можна вважати вітрифікований стан, отриманий у розчинах кріопротекторів з концентрацією близько 60 - 70%.

Отже, для повної вітрифікації позаклітинної рідини, що містить помірні концентрації кріопротектора, потрібне застосування надшвидкого охолодження; при повільному охолодженні відбувається вітрифікація тільки частини позаклітинної рідини, причому частка аморфної фази буде збільшуватися з підвищенням концентрації кріопротектора і зростанням швидкості охолодження. У свою чергу високі концентрації кріопротектора можуть забезпечити повну вітрифікацію навіть при повільному охолодженні.

Перевагою вітрифікації є відсутність основних факторів пошкодження – кристалізації, дегідратації та концентрації солей. Проблеми виникають при вітрифікації об'ємних біологічних зразків. У великих заморожених об'єктах можуть виникати температурні градієнти, що може спричинити їх розтріскування. І очевидно, що чим більший об'єм зразка, тим більші температурні градієнти можуть виникати при його охолодженні чи відігріванні.

Найчастіше та успішно вітрифікацію використовують для кріоконсервування раних (преімплантаційних) ембріонів людини, лабораторних та сільськогосподарських тварин. У цьому випадку говорять про «вітрифікацію ембріонів». Також проводять вітрифікацію сперматозоїдів та ооцитів, що допомагає боротися з безпліддям. Надшвидке заморожування використовують також для зберігання меристимальних (зародкових) тканин рослин.

## 2. ВІДІГРІВ

У процесі відігріву біологічні об'єкти піддаються додатковим негативним впливам:

**Перекристалізація.** При повільному відігріві швидко заморожених зразків реєструється «перекристалізація» позаклітинного, внутрішньоклітинного та тканинного середовищ – включення частини рідкої фази, що утворилася, в кристалічну структуру, укрупнення кристалів, зміна їх форми та розмірів, що супроводжується гіперконцентрацією



позаклітинного розчину. Ці перетворення не супроводжуються виділенням (поглинанням) тепла та калориметрично не реєструються.

**Рекристалізація.** Рекристалізаційні зміни у позаклітинному середовищі можуть відбуватися одночасно з рекристалізацією та плавленням внутрішньоклітинного льоду. Рекристалізацію відносять до факторів ушкодження, хоча механізм її дії залишається невизначеним. З негативними наслідками рекристалізації можна боротися, підвищуючи швидкість відігріву.

**Механічні впливи.** Під час рекристалізованого укрупнення внутрішньоклітинного льоду при відігріванні відбувається механічне пошкодження клітин. Тому при швидкому відігріві збереження багатьох видів попередньо заморожених клітин вище, ніж при повільному відігріві, оскільки знижується час перебування зразка в зоні рекристалізації.

**Термомеханічні напруги.** При відігріванні біооб'єктів від температури заморожування до зони фазових перетворень води основним фактором, що ушкоджує, можуть бути термомеханічні напруги.

**Осмотичні ефекти.** Після плавлення внутрішньоклітинного льоду клітини можуть зневоднюватись позаклітинним льодом при відігріванні. Подальше плавлення позаклітинного льоду розбавляє концентровані позаклітинні розчини. Повертаючись у вихідне середовище заморожування, клітини відновлюють свій об'єм, якщо їхня плазматична мембрана залишається неушкодженою. Підвищення температури на етапі відігріву сприяє відновленню вихідних властивостей біомембран, підвищує швидкість біохімічних реакцій.

**Постгіпертонічний лізис.** Відігрівання замороженої суспензії клітин призводить до різкого зменшення концентрації розчинених речовин у позаклітинному середовищі за рахунок танення льоду. Подібне повернення клітин до ізотонічного розчину після контакту з гіпертонічним розчином часто призводить до руйнування їх мембран. Це явище, як раніше було зазначено, називається постгіпертонічним лізисом. Оскільки розчинені речовини, як правило, проникають через клітинні мембрани значно повільніше, ніж молекули води, вирівнювання значень хімічного потенціалу води поза та всередині клітин відбувається практично тільки за рахунок потоку води в клітини, але не за рахунок виходу накопичених клітинами в період заморожування розчинених речовин. Для виключення постгіпертонічного лізису перед поверненням клітин у нормальні умови необхідно видалити розчинені речовини, у тому числі й кріопротектор, із суспензії поетапно, поступово (ступінчасто) знижуючи їх концентрацію у розчині, що відмиває.

***Існує три основні методи відігріву заморожених біооб'єктів:***

- відігрів способом теплообміну, наприклад, за допомогою нагрітої водяної бані, повітря або іншого теплоносія;
- відігрів у надвисокочастотному електромагнітному полі (НВЧ, УВЧ);
- відігрів об'єктів під тиском.

Відігрівання за допомогою теплообміну у вигляді водяної бані в даний час найбільш широко застосовується у практиці кріоконсервування різних біооб'єктів. Залежно від виду біооб'єкта використовують різні температури (37 - 42°C) та швидкості перемішування теплоносія. Однак такий спосіб відігріву має низку недоліків. До них можна віднести виникнення значного перепаду температур біля стінок і всередині контейнера, що розморожується, погану керованість процесом відігріву, оскільки здійснювати регулювання теплового потоку, який надходить до зразка, складно, відсутність рівномірного температурного поля за об'ємом зразка, в результаті чого виникають локальні перегріви біооб'єкта, що розморожується.

Теоретичний та експериментальний аналіз процесів, що протікають у біооб'єктах при їх заморожуванні методом зовнішнього контактного тепловідведення, показує, що перспективнішим є індукційне нагрівання за допомогою енергії електромагнітного поля. При цьому можна отримати високі швидкості підвищення температури та досягти її рівномірного розподілу по зразку. Однак для отримання оптимальних результатів необхідно попередньо з'ясувати характер зміни діелектричних властивостей біооб'єкта в залежності від частоти та потужності його НВЧ-нагріву, виявити характер розподілу поглиненого випромінювання та особливо фазових переходів у твердому зразку в процесі відігріву. Практично це означає, що у кожному окремому випадку необхідно проводити індивідуальні розрахунки потужності НВЧ-випромінювання для відігріву певного виду біооб'єкта. Крім того, обладнання для НВЧ-нагріву є досить дорогим і далеко не досконалим в аспекті отримання однорідного температурного поля в об'єкті, що розморожується, що вкрай необхідно при розробці методу НВЧ-обігріву. Отже, проблема відігріву біооб'єктів за допомогою НВЧ-нагріву багато в чому залишається невирішеною і потребує подальших розробок.

Третій спосіб розморожування біооб'єктів – теплопередачею під тиском – передбачає зміни одночасно температури зразка та тиску, при якому вода не кристалізується, незважаючи на низькі температури. Даний метод заморожування-відігрівання поряд з позитивними сторонами та перспективністю має суттєві негативні сторони. По-перше, високі тиски самі по собі можуть надавати негативні впливи на структурно-функціональний стан біооб'єкта. По-друге, методичні та технічні складності цього способу не дозволяють широко використовувати його на практиці.

### 3. ОСОБЛИВОСТІ ГЛИБИНИ ЗАМОРОЖУВАННЯ

Залежно від глибини охолодження біологічних об'єктів, діапазони температур можна умовно поділити на:

1. Гіпотермічні температури: 5 – 0°C.
2. Побутові низькі температури: мінус 1 – 10°C.
3. Мінімально низькі температури: мінус 11 – 20 °C.
4. Помірно низькі температури: мінус 21 – 60 °C
5. Низькі температури: мінус 61-195°C.
6. Ультранизькі температури: мінус 196 -273°C.

**1. Гіпотермічні температури.** При температурах до 0°C вода у біологічних об'єктах, а також у навколишньому середовищі залишається рідкою. Такі температури використовують для короточасного зберігання біологічних об'єктів, наприклад донорських еритроцитів (до 5 діб) або органів для подальшої трансплантації (до 3 діб). Зниження температури від 37 до 0°C призводить до зниження інтенсивності біохімічних процесів у клітинах і тканинах у 7-10 разів, що дозволяє зберігати їх 6-72 год. Процеси аутолізу, що протікають при цьому в тканинах, протягом цього часу не досягають критичних величин і дозволяють використовувати біологічні тканини для трансплантації. Більш тривале витримування біооб'єктів при гіпотермічних температурах веде до незворотних структурних змін у цитоплазмі та плазматичних мембранах, мітохондріях, лізосомах, генетичному апараті, мембранах ЕПР внаслідок посилення процесів ішемії. Фактори, що виникають у ході цих процесів, ведуть до дезінтеграції процесів синтезу речовин та отримання енергії в клітині, втрати клітиною іонної асиметрії та розбалансування ферментативних та регуляторних процесів.

Зберігання м'яса, риби, молочних та інших продуктів харчування в охолоджену вигляді (від 0 до 5°C) може здійснюватися нетривалий час – не більше 1-3 днів. Це пояснюється тим, що мікроорганізми з оптимальною життєдіяльністю при 15-20°C все ж таки дають зростання і при 0°C. З цієї причини продукти не можна довго зберігати в охолоджену вигляді. Однак деякі плоди та овочі в цілому вигляді і хорошого якісного стану, що мають природні захисні властивості, можуть при низьких плюсових температурах зберігатися досить тривалий час (коренеплоди, картопля, насіння, цитрусові плоди тощо).

**2. Побутові низькі температури: мінус 1 – 10°C.** Діапазон температур морозильної камери побутового холодильника – мінус 5 – мінус 8°C можна віднести для багатьох біооб'єктів до зони переохолодження. У цьому діапазоні позаклітинна вода та всі види внутрішньоклітинної води

замерзають, але не повністю. Однак метаболічні реакції у клітинах практично повністю зупиняються. При тривалому зберіганні біоб'єктів утворюються зовнішні та внутрішні кристали льоду, клітини зневоднюються, виникають кріопшкодження мембран та деяких органел. Для зберігання біологічних об'єктів із подальшим використанням у клінічній медицині такі температури практично не використовуються. Такий діапазон температур використовують для тривалого зберігання продуктів харчування. За цих температур зберігається можливість розвитку деяких мікроорганізмів у рідкому середовищі.

**3. Мінімально низькі температури: мінус 11-20°C.** При цих температурах вся позаклітинна та значна більшість внутрішньоклітинної води біологічних об'єктів кристалізується. Клітини зневоднюються та піддаються негативному впливу факторів заморожування. Пошкоджуються мембрани, органели та ферменти. Реакції метаболізму зупиняються, не утворюються енергія та нові молекули. Однак залишається можливість перебігу катаболічних процесів. Для зберігання біологічних об'єктів з подальшим використанням у клінічній медицині такі температури практично не використовуються.

Заморожування до діапазону мінімально низьких температур – надійніший спосіб збереження харчових продуктів, оскільки розвиток багатьох мікроорганізмів за таких умов неможливий. При заморожуванні більшість їх гинуть. Кисле середовище сприяє цьому, проте присутність цукрів, колоїдів має захисну дію. Відмирання бактерій під час обробки холодом пояснюється різними причинами: безпосереднім впливом холоду; механічним пошкодженням мікроорганізмів внутрішньоклітинними та міжклітинними кристалами льоду; змінами білків, що містяться в клітинах. Проте спори бактерій за цих умов добре зберігаються.

**4. Помірно низькі температури: мінус 21 – 60°C.** При цих температурах основна маса позаклітинної води та вільна внутрішньоклітинна вода замерзають. Зв'язана макромолекулами вода (менше 1%) у клітинах залишається у незамерзломому стані. При цій температурі в закристалізованій матриці зберігаються рідкі мікрофази, що містять концентровані розчини солей, які негативно впливають на стан плазматичної мембрани клітини і мембрани внутрішньоклітинних органел. Метаболізм у клітинах за цієї температури відсутня. Однак спостерігаються деякі руйнівні процеси у мікрофазах незамерзлої води. Тому температури до -80°C рідко використовують для тривалого зберігання біологічних об'єктів з подальшим використанням у клінічній медицині. Існують лише методики заморожування та зберігання в діапазоні цих температур кісток та хрящів. Зберігання м'яких біологічних тканин часто призводить до несприятливих результатів.

Мікроорганізми не розмножуються, не ростуть, багато гине, що значно збільшує час зберігання.

**5. Низькі температури: мінус 61-195°C.** Температура сухого льоду (сублімації діоксиду вуглецю), що становить мінус 78,5 °C, температура компресорних холодильних камер – мінус 80 °C та температури парів рідкого азоту відносять у кріобіології та кріомедицині до діапазону низьких температур. У цьому діапазоні температур позаклітинна, вільна та зв'язана внутрішньоклітинна вода знаходяться у замерзлому стані. Кристалізація їх стійка. Міцно зв'язана молекулами фракція води в клітинах може трохи зберігатися в незамерзлому стані. Метаболізм, як анаболізм, так і катаболізм, повністю відсутні. Клітинні структури перебувають у стабільному консервованому стані.

Температури цього діапазону цілком обґрунтовано використовують для тривалого зберігання тканин та клітинних суспензій. Такі умови кріоконсервування клітин мають свої переваги, оскільки відрізняються відносною простотою та можливістю широкого застосування. Ця технологія дозволяє використовувати для зберігання звичайні компресорні морозильні камери. Відомі технології кріоконсервування за цих температур еритроцитів донорської крові. Особливістю цієї технології є використання режимів повільного заморожування та необхідність використання кріоконсервантів з високими концентраціями гліцерину (кінцева концентрація в заморожених еритроцитах близько 40% (4.77M)).

Технології повільного заморожування еритроцитів до мінус 80°C з великими концентраціями гліцерину вимагають складнішої процедури відмивання після відігріву, проте мають ряд переваг:

- ✓ заморожування та зберігання еритроцитів здійснюється в камерах електрорефрижераторів та не вимагає наявності рідкого азоту;
- ✓ заморожування, зберігання та відмивання можна проводити у стандартних пластикових контейнерах;
- ✓ допускається короткочасне коливання температури, яке не супроводжується значним пошкодженням клітин;
- ✓ можливе транспортування крові в замороженому стані в сухому льоду та ізотермічному контейнері.

Рекомендований термін зберігання клітинних суспензій у парах рідкого азоту – до 10 років.

Температури цього діапазону застосовують також для тривалого зберігання та використання в медичній практиці кровоносних судин, шкіри, хряща та кісток. Існують і методики кріоконсервування клітинних суспензій у парах зрідженого азоту для подальшого використання у клініці.

**6. Ультранизькі температури: мінус 196 - 273°C. Температура рідкого азоту.** У більшості випадків для довгострокового зберігання клітинних суспензій та різних біологічних тканин використовують температуру рідкого азоту – мінус 196°C, яку відносять до діапазону *ультранизьких температур*. У цьому температурному діапазоні вся вода в клітинах повністю замерзає. Усі хімічні та фізичні процеси повністю зупинені, тільки здійснюються переходи електронів в атомах молекул з однієї орбіти на іншу. Мікроорганізми повністю зруйновані чи дезактивовані. Але основні клітинні структури біологічних об'єктів зберігаються у стабільному, законсервованому стані. Макромолекули клітин (білки, ліпіди та нуклеїнові кислоти) знаходяться у зафіксованому стані та після розморожування зберігають свої структуру та функції. В умовах такого глибокого заморожування біологічні об'єкти можуть зберігатися протягом багатьох років.

На основі ультранизьких температур існують спеціальні технології кріоконсервування клітинних суспензій: еритроцитів, тромбоцитів, лейкоцитів, лімфоцитів, мієлокаріоцитів, гепатоцитів та ін., а також різних тканин для потреб клінічної та експериментальної медицини.

#### **4. ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ЗАМОРОЖУВАННЯ ТА КРІОКОНСЕРВАЦІЇ**

Обладнання для заморожування, зберігання, переміщення зразків при понижених температурах та відігріву представляють собою різноманітні групи пристроїв.

*Програмні заморожувачі* – це комплексні електронні пристрої, призначені для забезпечення заданого та точного охолодження біологічних об'єктів до низьких та наднизьких температур з метою подальшого низькотемпературного зберігання з можливістю відновлення прижиттєвих функцій. Програмні заморожувачі укомплектовані резервуарами рідкого азоту високого тиску для виконання режиму заморожування.

*CryoMed (Thermo Fisher Scientific)* – програмні заморожувачі для контрольованого охолодження різних біологічних об'єктів (сперма, ембріони, клітини, препарати та компоненти крові). Камера заморожувача виконана із полірованої сталі. Для забезпечення герметичності між дверцятами камери та камерою використовуються дві порожнисті прокладки. Два клапани дозволяють точно контролювати температуру та збільшувати швидкість заморожування. Для максимально рівномірного розподілу температури в камері використовується примусова вентиляція. Під час роботи запобігає передчасному початку процесу кристалізації та наростання інею в камері.

При відкриванні дверцят автоматично припиняється подача рідкого азоту. У процесі заморожування здійснюється температурний контроль камери та зразка. Заморожувач має шість стандартних протоколів та десять протоколів, програмованих користувачем (рис. 3 А, Б).

Програмні заморожувачі серії *Kryo (Planer)* оснащені системним контролером MRV, який підтримує декілька протоколів. На графічному дисплеї відображаються дані про хід процесу в реальному часі (значення кінцевої температури, температури зразка та температури камери, стадія програми та поточний профіль температур), які доступні для перегляду та роздруківки на вбудованому принтері після завершення протоколу. Кінцева температура – мінус 100-180 ° С забезпечує цілісність зразків під час транспортування до сховища. Кріозаморожувачі можуть довго витримувати зразок при кінцевій температурі протоколу. Установки захищені паролем доступу, який є частиною багаторівневої системи захисту зразків. Процес може бути розпочато при температурі вище температури навколишнього середовища. Нагрів повністю контролюється (рис. 3 А).

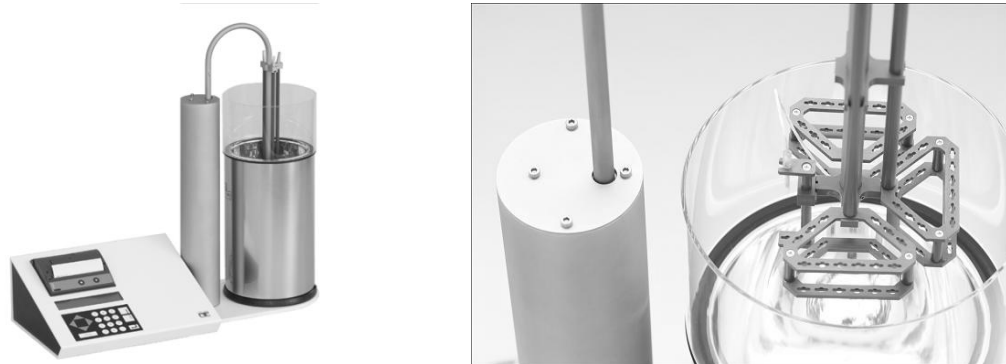
*Pressurized Stainless Steel Tank 812 (Thermo Fisher Scientific)* – сталеві резервуари високого тиску для рідкого азоту, що під'єднуються до програмних заморожувачів. Усі резервуари мають сталеву ємність для рідкого азоту, вентилі та регулятори тиску.



**Рис. 3. Загальний вид програмного кріозаморожувача (А) та резервуара для рідкого азоту (Б). (Пояснення у тексті)**

Програмний заморожувач *STE 220* (Рис. 4) працює за принципом «відкритої ємності»: замість використання закритої камери система занурює

соломини вздовж градієнта температур, який встановлюється після заповнення ємності рідким азотом. Користувач може зберегти до дев'яти програм заморожування в енергонезалежній пам'яті.



**Рис. 4. Загальний вид програмного заморожувача STE2200**

*Транспортні ємності Дьюара* (Рис. 5). Настільні контейнери ThermoFlask (Thermo Fisher Scientific) призначені для зберігання невеликих об'ємів рідкого азоту в різних галузях промисловості, що використовують скраплені гази, а також у медичних установах. Корпус кріоконтейнерів ThermoFlask виготовлений із нержавіючої сталі, емальованої сталі або пластику, об'єм від 200 мл до 10 л. Серед моделей є переносні кріоконтейнери з ручками та кришками, дрібні контейнери з широкою горловиною, пластикові контейнери та емальовані контейнери, з кришками та ручками та без них. Широкий вибір моделей дозволяє вибрати ємність практично під будь-яке завдання. Наприклад, низька широка посудина з широкою горловиною рекомендована для робіт з колотим і сухим льодом.



**Рис. 5. Загальний вид ємностей Дьюара різних розмірів**



Переносні системи зберігання в рідкому азоті серії *CMR/CMC (Thermo Fisher Scientific)* призначені для тривалого та безпечного зберігання зразків у контейнерах за мінімальної кількості азоту. Контейнери виготовлені з ударостійкого легкого алюмінію та забезпечені замком на кришках. У цьому обладнанні реалізовано принцип із вакуумною теплоізоляцією. Контейнери укомплектовані штативами для зразків, які мають різне забарвлення для полегшення пошуку необхідного біоматеріалу.

### УЗАГАЛЬНЕННЯ

Порівняння переваг і недоліків можливих режимів заморожування наведено в таблиці 2.

Таким чином, стратегія вибору та особливості застосування тих чи інших режимів заморожування та відігріву заснована на мінімізації дії на клітину різних кріопшкоджуючих факторів для більш повного збереження її структурно-функціонального стану. При можливості використовують режими, що забезпечують вітрифікований стан клітинної суспензії, що заморожується, або багатоетапні режими охолодження. Основна стратегія вибору швидкості заморожування та кріопротекторів полягає у запобіганні кристалізації, особливо з великими кристалами, та забезпеченні м'якої дегідратації клітин перед затвердінням суспензії.

**Таблиця 2. Особливості режимів заморожування**

Ознака	Режими заморожування			
	Повільні	Швидкі	Надшвидкі	Багатоступеневі
<b>Особливості кристалізації</b>	Початково позаклітинна	Внутрішньоклітинна	Відсутня	Позаклітинна
<b>Особливості дегідратації</b>	Осмотична дегідратація	Відсутня	Відсутня	Осмотична дегідратація
<b>Ефекти розчину</b>	Вплив гіперконцентрацій	Не спостерігаються	Не спостерігаються	Мінімізуються
<b>Вітрифікація</b>	Відсутня	Можлива	По всьому об'єму	Відсутня
<b>Механічні пошкодження</b>	Спостерігаються	Спостерігаються	Не спостерігаються	Не спостерігаються

Біологічні об'єкти сильно відрізняються за розмірами, формами, будовою та організацією. Тому для кожного об'єкта підбирається найбільш сприятливий спосіб заморожування.

Зокрема, на результати кріоконсервування мікроорганізмів, як і інших клітинних суспензій, впливає швидкість охолодження, оскільки вона регулює рівень дегідратації, ступінь кристалоутворення, фазові переходи ліпідів у мембранах і т. д. При охолодженні для кожного виду мікроорганізмів існує своя оптимальна швидкість, яка багато в чому зумовлена проникністю плазмолемми для води, а також розмірами клітин та їхньою формою. Оскільки проникність мембран більшості мікроорганізмів для води низька, хороші результати при кріоконсервуванні одержують, використовуючи повільні швидкості охолодження. Крім повільних, рекомендуються також ступінчасті режими заморожування, а при консервації з кріопротекторами хороші результати для деяких мікроорганізмів отримують і при досить швидкому заморожуванні. На практиці при кріоконсервуванні мікроорганізмів (бактерій, мікоплазм грибків та ін.) найбільш добре зарекомендували себе розчини гліцерину з різноманітними добавками.

Низькотемпературна консервація еритроцитів може здійснюватися шляхом заморожування клітин до мінус  $196^{\circ}\text{C}$  зі швидкістю 200 – 300 град/хв під захистом 15 – 20%-го розчину гліцерину або іншого кріопротектора, який легко проникає через плазматичну мембрану клітин при кімнатній температурі та запобігає формуванню крупних внутрішньоклітинних кристалів льоду. В ІПКіК розроблено технологію кріоконсервування еритроцитів під захистом кріозахисного розчину – пропандіосахаролу (1,2-пропандіол, сахароза, хлористий натрій), використовуючи двоетапний режим заморожування.

Ядерні клітини більш чутливі до дії низьких температур, ніж без'ядерні. Кріоконсервування суспензій ядерних клітин здійснюють під захистом проникаючих (гліцерин, ДМСО, ДМАЦ) та частково проникаючих (ПЕО м.м. 400) кріопротекторів з можливим додаванням сахарози. Найбільш прийнятний дво-, три- або чотириетапний режим заморожування з тимчасовою експозицією. Заморожування природних білкових сумішей (плазма та сироватка крові, фолікулярна рідина, водно-сольові екстракти плаценти) з несприятливими режимами (від 1 до 7 град/хв) призводить до розпушування поверхневих поліпептидних ланцюгів та агрегації біомакромолекул. Для збереження нативних властивостей біомакромолекул при кріоконсервуванні білкових розчинів без кріопротекторів необхідне використання охолодження зі швидкістю не менше 100 град/хв..

Кріоконсервація фрагментів біологічних тканин здійснюється під захистом проникаючих кріопротекторів – гліцерину, ДМСО, пропіленгліколю, ПЕО м.м. 400 із використанням двоетапного заморожування.

Найбільш ефективно консервацію органів проводять способом гіпотермії, що поєднує охолодження до 0°C і безперервну перфузію, що дозволяє зберегти їх на період до 72 год. Кріоконсервування органів ссавців та людини (нирка, печінка, серце, мозок) в даний час неможливе через руйнування тканин органів кристалами льоду.

## КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. На які швидкісні режими поділяються процеси заморожування біологічних об'єктів?
2. Який діапазон швидкостей характерний для повільного заморожування?
3. Який діапазон швидкостей характерний для швидкого заморожування?
4. Який діапазон швидкостей характерний для надшвидкого заморожування?
5. Від яких умов залежить вибір режиму заморожування біооб'єктів.
6. Якими причинами обумовлені кріопшкодження клітин та тканин у процесі повільного заморожування?
7. Що являє собою кристалізація, рекристалізація та перекристалізація водних розчинів?
8. Чим відрізняється внутрішньоклітинна кристалізація від позаклітинної кристалізації при повільному заморожуванні?
9. Що являє собою дегідратація клітин при повільному заморожуванні?
10. У результаті чого біооб'єкти піддаються дії концентрованих солей при повільному заморожуванні?
11. Як технічно забезпечується повільне заморожування із певною швидкістю?
12. Що являє собою термограма розчину, що повільно заморожується?
13. Що таке температурна евтектична зона при повільному заморожуванні біологічних об'єктів?
14. Які фактори кріопшкоджень діють на клітини та тканини в евтектичній зоні при повільному заморожуванні?
15. Який вплив на евтектичну зону мають кріопротектори при повільному заморожуванні?
16. Як здійснюється швидке заморожування біооб'єктів?

17. Якими процесами при швидкому заморожуванні обумовлено пошкодження біологічних об'єктів.
18. Які фактори враховуються під час вибору оптимальної швидкості заморожування?
19. Що таке багатоетапне заморожування?
20. Які переваги має надшвидке заморожування?
21. Що таке вітрифікація біологічних об'єктів при надшвидкому заморожуванні?
22. Для яких об'єктів найчастіше використовують вітрифікацію?
23. Яка температура кипіння рідкого азоту?
24. Які негативні процеси протікають під час відігріву біооб'єктів?
25. Які існують основні методи відігріву біологічних об'єктів після заморожування?
26. На які діапазони низьких температур поділяється глибина заморожування біооб'єктів?
27. Які негативні процеси протікають за гіпотермічних температур зберігання біооб'єктів?
28. Для яких цілей заморожування використовують низькі побутові температури?
29. Що відбувається з біооб'єктами при зберіганні за мінімально низьких температур?
30. Чим характеризуються біооб'єкти під час зберігання при помірно низьких температурах.
32. Чому діапазон низьких температур є найбільш сприятливим для довгострокової кріоконсервації біологічних об'єктів?
32. У якому стані знаходяться біооб'єкти при зберіганні в діапазоні ультранизьких температур?
33. Що таке програмні заморозувачі біологічного матеріалу?
34. Як здійснюється багатоетапне програмне заморожування?
35. Як здійснюється швидке заморожування?
36. Як здійснюється надшвидке заморожування?
37. Яку будову мають ємності Дьюара і навіщо використовуються?

## ЛІТЕРАТУРА

1. Основи кріобіології і кріомедицини. Підр. для студентів-біологів і медиків / [Г. Ф. Жегунов та ін.] ; під ред. проф. Г. Ф. Жегунова і О. А. Нардида ; Харків. гос. зооветеринар. акад. МОН України, Ін-т проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, ННЦ "Ін-т експеримент. і клін. ветеринар. медицини" НААН України. - Харків : Бровін А. В. [вид.],2019. - 614 с. - ISBN 978-617-7738-35-9.
2. Fowler A, Toner M. Cryo-injury and biopreservation. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1066:119–35. [[Google Scholar](#)]
3. Gao D, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR* 2000;41:187–96. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
4. Willem F. Wolkers and Harriëtte Oldenhof (eds.), (2015). Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, [Methods in Molecular Biology], vol. 1257, DOI 10.1007/978-1-4939-2193-5\_1, © Springer Science+Business Media New York.
5. Peg DE. The history and principles of cryopreservation. *Semin Reprod Med.* 2002 Feb;20(1):5-13. doi: 10.1055/s-2002-23515

Навчально-методичне видання

**ДЕНИСОВА** Ольга Миколаївна  
**ЖЕГУНОВ** Геннадій Федорович  
**НАРДІД** Олег Анатолійович  
**ГЛАДКА** Наталія Іванівна

**ШВИДКІСТЬ ТА ГЛИБИНА ЗАМОРОЖУВАННЯ БІОЛОГІЧНИХ  
ОБ'ЄКТІВ**

Навчально-методичний посібник

Формат 60x84/16. Гарнітура Times New Roman  
Папір для цифрового друку. Друк ризографічний.  
Ум. друк. арк. 1,3.  
Наклад \_\_ пр.  
Державний біотехнологічний університет  
61002, м. Харків, вул. Алчевських, 44