



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

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

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

# **КРІОКОНСЕРВУВАННЯ БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ**

**Навчально-методичний посібник**

**Харків  
2025**

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

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

## **КРІОКОНСЕРВУВАННЯ БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ**

### **Навчально-методичний посібник**

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

Затверджено  
Рішенням Науково-методичної комісії  
факультету ветеринарної медицини  
ДБТУ  
Протокол № 7  
Від 19 березня 2025 р.

Харків  
2025

Схвалено на засіданні  
кафедри фізіології та біохімії тварин ДБТУ  
Протокол № 11 від 10 березня 2025 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.

**Жегунов Г.Ф.**

Є-Ж46 Кріоконсервування біологічних об'єктів [Текст]: навч.-метод. посіб. для здобувачів другого (магістерського) рівня вищої освіти зі спеціальностей 211 Ветеринарна медицина та 162 Біотехнології та біоінженерія / Г.Ф. Жегунов, О.М. Денисова, Н.І. Гладка ; Держ. біотехн. ун-т. – Харків, 2025.– 18 с.

У методичних рекомендаціях подано основний навчальний матеріал для самостійної підготовки студентів ветеринарного факультету з кількох дисциплін Кріобіологія, Кріомедицина, Кріоветеринарія. У методичних рекомендаціях докладно описуються методи кріоконсервування клітин та тканин тварин.

УДК 664.8.037.5(075) К80

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

1.	Дія заморожування-відігрівання на тканини та органи	5
2.	Проблема заморожування органів	6
3.	Кріоконсервування рогівки	7
4.	Кріоконсервування кісткової тканини	8
5.	Кріоконсервування хряща	9
6.	Кріоконсервування шкіри	10
7.	Кріоконсервування судин	11
8.	Кріоконсервування кінцівок	11
9.	Кріоконсервування ендокринних органів	12
9.1.	Щитоподібна залоза	13
9.2.	Наднирники	13
9.3.	Острівці Лангерганса	14
9.4.	Чоловічі гонади	14
9.5.	Оваріальна тканина	15
10.	ЛІТЕРАТУРА	17

## **ЗМІСТ**

## 1. Дія заморожування-відігрівання на тканини та органи

При заморожуванні біологічних об'єктів відбувається затвердіння клітинної та неклітинної води. Це призводить до значних змін у їхньому стані. При загальному збереженні організації та структури біооб'єктів відбувається повна зупинка метаболізму та функцій. Це пов'язано з тим, що всі життєві процеси протікають тільки в рідкому водному середовищі, а затвердіння водного оточення біологічних структур повністю зупиняє рух усіх молекул, що припиняє роботу ядра, мітохондрій, рибосом та інших органел, а також всіх клітин. Ферменти також повністю переривають свої функції, оскільки їх субстрати не рухаються і досягають їх активних центрів, та й самі молекули ферментів перебувають у твердому нерухомиому стані. У замороженому стані відзначається повна зупинка життєвих процесів, зупиняється газообмін, припиняється використання енергії та речовин, відбувається фіксація біологічної структури. Але дуже важливо помітити, що в замороженому стані відбувається повна зупинка спонтанного руйнування клітин, тканин і органів. Тому ентропія замороженої високоорганізованої біологічної системи не підвищується, що зумовлює можливість кріоконсервування та тривалого зберігання біологічних об'єктів.

Однак фізико-хімічні фактори заморожування все-таки суттєво ушкоджують клітинні та тканинні структури, що зазвичай проявляється на стадії відігріву. Ступінь ушкодження складних біологічних об'єктів, зумовлених заморожуванням і відтаванням, залежить від температури, тривалості заморожування, кріопротекторів, швидкості охолодження та інших факторів. Структурно-функціональні порушення в тканинах та органах *після заморожування-відігрівання* спостерігаються на кількох рівнях.

- **Молекулярний.** Дії факторів заморожування призводять до порушення структури та функцій багатьох структурних білків, ферментів та молекулярних функціональних комплексів.
- **Мембранний.** Більшість клітинних органел має мембранну основу будови. Тому пошкодження їх структури та функції призводить до порушення багатьох біохімічних процесів та дискоординації метаболізму.
- **Клітинний.** Пошкоджуються ядро, органели, структура цитозолу та цитоплазматична мембрана. Клітина втрачає внутрішній гомеостаз та функціональність.
- **Міжклітинний.** В результаті заморожування-відігріву ушкоджуються міжклітинні контакти, руйнується структура глікокаліксу. Орган або тканина втрачають свою монолітність, клітинну координацію та керованість.
- **Макроструктурний.** Кристали льоду, що ростуть крізь орган, можуть просто розколоти його на окремі частини.
- **Трофічний.** Пошкоджується капілярно-судинна система постачання об'єкта киснем та поживними речовинами. Розвивається ішемія, нестача субстратів, накопичення шлаків та метаболітів (амоній, сечовина, лактат).
- **Функціональний.** У результаті тканина чи орган отримують ушкодження, несумісні з функціонуванням.

Таким чином, заморожування може істотно впливати на структурно-функціональний стан клітин, тканин та органів. Заморожування-відігрівання змінює фізичний стан ліпідів і ускладнює мембранозв'язані процеси, такі як транспорт речовин, іонно-осмотичну регуляцію та внутрішньоклітинну взаємодію. Ушкодження клітин відбуваються також і від осмотичної втрати води, що веде до клітинного стискання та гіперосмотичного ефекту на макромолекули, мембрани та клітинний гомеостаз. Так, наприклад, розриваються мембрани, порушується осмотична рівновага, клітини втрачають автономність, порушуються їхній метаболізм і функції.

Більшість простих ферментів відносно легко переносять заморожування-відігрівання і відновлюють свою активність. Але складні білки та мембранозв'язані ферменти можуть істотно пошкоджуватися та втрачати свою активність. Зокрема, білки, що складаються з кількох субодиниць, при заморожуванні розпадаються на кілька складових, а при відігріванні можуть відновлюватися вже не в тому складі. Так, лактатдегідрогеназа, що складається з 4 субодиниць, відновлюється в інші полімерні форми, що не мають активності. А мембранні ферменти «видавлюються» з ліпідного бішару, змінюють свою конформацію в процесі заморожування і, в більшості випадків, не повністю відновлюються після відігріву.

Крім ефектів, які має кріоконсервація органів на клітини, необхідно також враховувати руйнування міжклітинних контактів, клітинних взаємодій, а також порушення позаклітинної речовини. Зокрема, неадекватні режими кріоконсервування призводять до розтріскування органу під час охолодження через наявність температурних градієнтів. На рослинних тканинах було показано, що кристалізація часто поширюється вздовж клітин у просторі між клітинною стінкою та цитоплазматичною мембраною, що може призводити до механічного розколу тканини.

Первинним місцем утворення кристалів льоду є міжклітинна речовина. Крім розколу тканини, кристали льоду, що з'явилися в міжклітинному просторі, потенційно можуть індукувати і внутрішньоклітинну кристалізацію внаслідок міграції льоду через мембрану плазми. Проникнення кристалів льоду в клітини кровоносних судин порушує їхню архітектуру, структуру та функції капілярів, запускає ішемічний некроз або апоптоз.

Навіть застосування кріопротекторів та щадних режимів заморожування не забезпечує повний захист складних біологічних об'єктів при кріоконсервуванні.

## **2. Проблема заморожування органів**

Необхідність кріоконсервації тканин та органів обумовлена зростаючою потребою у цих органах як матеріалу для трансплантації.

Однак використання кріоконсервування для зберігання великих складних органів людини і тварин залишається поки що поза межами практичного застосування.

Експериментально було показано можливість кріоконсервування деяких органів тварин (щури, свині). Наприклад, нирку щура вдалося заморозити після перфузії розчинами, що містять ДМСО та гліцерин. Однак після відігрівання орган далеко не

завжди був здатний повноцінно функціонувати. Аналогічні експерименти було проведено з печінкою тварин. Але тільки в деяких випадках печінка мишей або поросят після заморожування-відігрівання із застосуванням етиленгліколю мала нормальну гістологічну структуру і була здатна синтезувати жовч після трансплантації.

Кріоконсервування таких органів як печінка, легені, нирка, підшлункова залоза є проблемою з кількох причин. В основному ці причини зводяться до двох: *великий об'єм та гетерогенність структури органу*.

- Органи досить великі, порівняно з клітинами. Великий об'єм органів неминуче пов'язаний з малим, порівняно з клітинами, відношенням поверхневої площі до об'єму клітин. У процесі кріоконсервування це неминуче веде до виникнення температурних градієнтів, у яких поверхня органу має значно нижчу стосовно центру температуру. Це може спричинити розтріскування або навіть розрив органу в процесі заморожування.
- Органи складаються з величезної кількості різних клітин, які мають різну стійкість до умов кріоконсервування. Більше того, через значний об'єм органу, навіть клітини одного типу опиняються в різних умовах.
- Через велику кількість, рівномірне насичення органу кріопротекторами є важким, що призводить до нерівних умов заморожування різних частин об'єкта.
- Різні органи характеризуються індивідуальними морфо-функціональними структурами, як-то: інтерстиціальна тканина, нефрони, часточки, альвеоли, ацинуси, острівці Лангерганса та ін. Вони мають різну кріочутливість і будуть пошкоджуватися різною мірою. Крім цього, поширення кріопротекторів та фронту кристалізації у цих структурах буде не однаковим і може призводити до механічного пошкодження структур.

Розробляються підходи щодо застосування методів вітрифікації для заморожування органів. Вітрифікація загалом дозволяє уникнути ріст кристалів льоду. Однак вона пов'язана із застосуванням розчинів, що містять високі концентрації кріопротекторів, що є досить токсичним для біоб'єктів. Дуже часто ці розчини містять комбінації проникаючих (ДМСО, гліцерин, пропан-1,2-діол) і непроникаючих кріопротекторів (полівінілпіролідон, поліетиленгліколь, полівініловий спирт), а також додатково глюкозу, сахарозу, трегалозу.

Хоча було показано можливість заморожування нирки, загалом проблема зберігання органів у замороженому чи вітрифікованому стані залишається не вирішеною, але перспективним завданням.

Однак цілком доступне заморожування та довгострокове зберігання невеликих ізольованих біологічних об'єктів: малих частин тіла, шматочків тканин та органів.

### **3. Кріоконсервування рогівки**

Трансплантація рогівки, або кератопластика, є одним із способів лікування хвороби, травм та опіків очей, що дозволяє покращити гостроту зору або зберегти

цілісність цього органу. Звичайно, створення банку доступного матеріалу для трансплантації дозволяє зробити цю операцію рутинною.

Ще 1963 року було показано можливість кріоконсервування рогівки кроля. У 1978 році харківськими вченими Інституту проблем кріобіології та кріомедицини було розроблено спосіб низькотемпературного кріоконсервування рогівки людини з кріопротектором ПЕО-400. Метод включає в себе наступні етапи:

1. Перенесення рогівки в спеціальний контейнер епітелієм вгору.
2. Інкубація рогівки з 10% ПЕО-400 при температурі 18-20° С, 10 хв.
3. Програмне повільне охолодження біооб'єкта в контейнері зі швидкістю 1-2 град/хв до мінус 6°С, а потім швидко занурення в рідкий азот, мінус 196°С.
4. Відігрівання контейнера з рогівкою проводять на водяній бані при 42°С протягом 55-60 сек.
5. Перенесення рогівки у фізіологічний розчин для гідратації та видалення кріопротектора на 3-5 хв при 18-20°С.
6. Поміщення рогівки у фізіологічний розчин.

Було показано гарне збереження клітин ендотелію. Однак встановлено, що наявність життєздатних клітин рогівки не є необхідною умовою для консервування рогівки.

Зважаючи на те, що при заготівлі рогівки часто немає необхідності зберігати живі клітини, методи її заготівлі для кератопластики можуть бути більш простими, що полегшує завдання створення банків та здешевлює технологію. Наприклад, було показано, що рогівка, яка була просто заморожена до мінус 80°С у розчині 20% гліцерину, після відігріву залишалася цілою, мала нормальну товщину, прозорість, механічну міцність та морфологічну структуру.

#### **4. Кріоконсервування кісткової тканини**

Кісткові трансплантати широко використовуються в стоматології для лікування атрофії кісткової тканини щелепи, яка може бути результатом травми, онкологічного захворювання, інфекції порожнини рота або вродженої відсутності зубів. Стандартом для трансплантації у таких випадках є трансплантація аутологічної кістки. Однак цей підхід не завжди є доступним. Тому найчастіше використовують донорський алогенний матеріал, узятий від трупа. Для кріоконсервування кісток було запропоновано використовувати протокол, який включає наступні етапи:

1. Забір матеріалу (гомілкової кістки) протягом перших 12 годин після смерті донора.
2. Дезінфекція кістки протягом 72 год при 4° С в розчині, що містить ванкоміцин, поліміксин, глазидин, лінкоміцин.
3. Ополіскування матеріалу у стерильному фізіологічному розчині.
4. Заморожування кістки у фізіологічному розчині без кріопротекторів до мінус 80°С.
5. Довгострокове низькотемпературне зберігання .
6. Розморожування та підготовка до трансплантації.



## 5. Кріоконсервування хряща

Особливості кріоконсервування хрящів багато в чому залежить від мети використання, а також типу хрящів. Суглобовий хрящ – це тканина, що містить в основному лише один вид клітин (хондроцити), без кровоносних та лімфатичних судин та нервів. Ці клітини отримують поживні речовини і позбавляються продуктів життєдіяльності через екстраклітинний матрикс в синовіальну рідину. Особливістю хряща є дуже обмежені можливості для самооновлення.

Заміна хряща може бути запропонована у разі травматичного ушкодження, епіфізарного раку, артриту. Єдина техніка, яка дозволяє відновити частину або цілий суглоб – це остеохондральна трансплантація, яка пов'язана з трансплантацією кістки та хряща. Ця тканина повинна бути взята не пізніше 24 годин після смерті донора і використана протягом 2-3 діб, що істотно обмежує доступність хрящів для трансплантації.

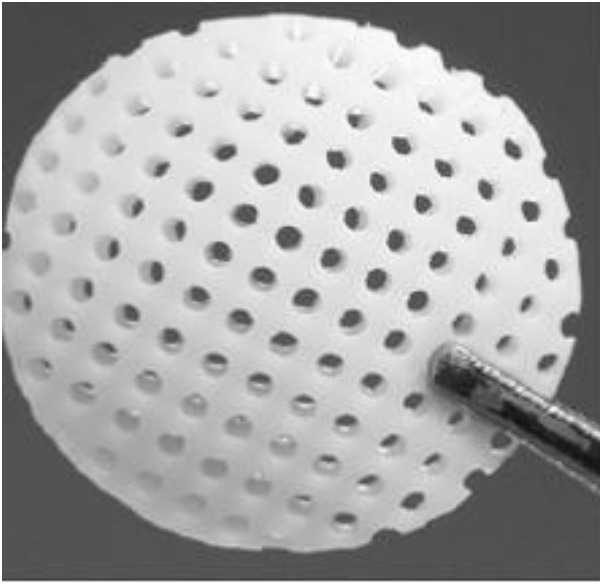
Одним із способів продовжити існування трансплантату є використання гіпотермічного зберігання при 4°C. Однак воно істотно погіршує якість трансплантата. Тому успішне кріоконсервування істотно збільшує час зберігання та доступність матеріалу для трансплантації.

Для консервування хряща запропоновано використовувати наступний протокол:

1. Перенесення цілого блоку колінного суглоба від 18-60-річних донорів у водно-крижану шугу не пізніше 120 годин після смерті.
2. Вирізання остеохондральних блоків (10-20 мм в діаметрі і 1-3 мм завтовшки) з дистальної стегнової та проксимальної гомілкової кістки.
3. Видалення кісткової частини кожного блоку, залишаючи тільки гіаліновий хрящ та залишкову субхондральну кістку.
4. Пророблення пір через усю товщину остеохондрального блоку (рис. 1) для поліпшення трофіки хряща.
5. Заморожування в розчині, що містить 7-10% ДМСО за допомогою програмного заморожувача зі швидкістю 1 град/хв та зберігання при мінус 80° С.
6. Відігрівання остеохондральних блоків на водяній бані при 37° С і промивання у фізіологічному розчині.

Розробляються також методи вітрифікації хряща, які мають певні складності, головним чином пов'язаними з товщиною хряща, яка перешкоджає вільному проникненню кріопротекторів.

Крім суглобового хряща, у клініці досить широко використовується трансплантація міжхребцевих дисків. На сьогоднішній день існують два основних типи імплантату міжхребцевого диска: штучний, наприклад, М6-С, зроблений з інертних матеріалів, що не викликають запальну реакцію, а також алогенні міжхребцеві диски, отримані від трупних донорів. При цьому як середовище заморожування використовується RPMI -1640 з 10% ДМСО та 10% телячої сироваткою. Однак розробка протоколів для кріоконсервування міжхребцевих дисків залишається швидше областю експериментальних досліджень.



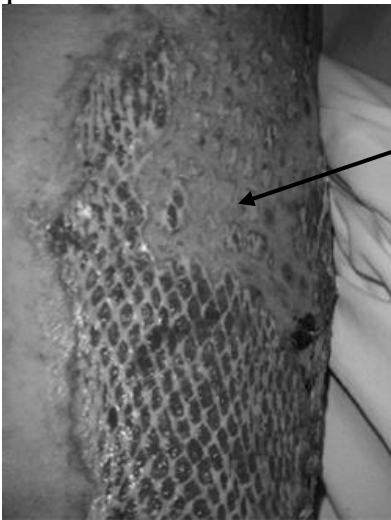
**Рис. 1.** Підготовлений для заморожування блок хрящової тканини (з Sandra Geraghty, Jin-QiangKuang, Dana Yoo, Michelle LeRoux-Williams, C. Thomas Vangsness Jr, Alla Danilkovitch. *A novel, cryopreserved, viable osteochondral allograft designed to augment marrow stimulation for articular cartilage repair.* Geraghty et al. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* (2015) 10:66. DOI 10.1186/s13018-015-0209-5).

## 6. Кріоконсервування шкіри

Трансплантація шкіри може бути використана для лікування ран та опіків. Трансплантація шкіри сприяє захисту від зневоднення, від мікробної контамінації, сприяє реепітелізації та послабленню болю. Дуже часто, особливо при великих опіках, пацієнт не може бути джерелом аутологічної шкіри. Тому необхідні запаси шкіри алогенного походження.

Однак використання алогенного матеріалу розглядається як тимчасове покриття ранової поверхні, що сприяє загоєнню. Він, зрештою, зазнає імунологічного відторгнення.

На малюнку 2 показаний результат трансплантації деєпідермізованої кріоконсервованої шкіри, що свідчить на користь використання девітелізованих шкірних трансплантатів.



**Мал. 2.** Кріоконсервований шкірний трансплантат, що покриває поверхню опіку. Стрілкою позначені ділянки реепітелізації після трансплантації деєпідермізованої шкіри

(з Tognetti.L, Pianigiani.E, Ierardi.F, Mariotti.G, Perotti.R, DiLonardo.A, Rubegni.P, Fimiani.M. *Current in sights.in.to. skin banking: storage, preservation and clinical importance of skin allografts* 18 July 2017 Volume 2017:5 Pages 41-56).

Кріоконсервування шкіри включає наступні основні етапи:

1. Забір ділянок шкіри від трупного донора.
2. Дезінфекція шкіри за допомогою розчинів антибіотиків.
3. Інкубація у розчині з кріопротектором. Зазвичай використовують 20-30% гліцерин або 7-15% ДМСО.
4. Поміщення зразків у контейнери та охолодження до мінус 80°C зі швидкістю 1-4 град/хв при використанні ДМСО та 7-8 град/хв при використанні гліцерину.
5. Відігрівання шкіри проводять на водяній бані при температурі 38°C.

## **7. Кріоконсервування судин**

Трансплантація аутовен (і в деякій мірі аутоартерій) є основним методом реконструкції артерій середнього і малого калібру ( $\leq 8$ мм). Ще на початку минулого століття було проведено успішні операції з трансплантації судин. Однак на практиці може виникнути проблема нестачі судин відповідної довжини або просвіту. Це зумовлює розробку способів одержання штучних судин, виготовлених із синтетичних матеріалів, а також способів кріоконсервування судин.

Відомі різні способи зберігання судин. Наприклад, зберігання в сольових розчинах при температурах 0-4° С, зберігання в рідкому гелії, аутологічній сироватці, охолодження до мінус 70° С і подальше зберігання при температурі твердого вуглекислого газу (близько мінус 70° С), ліофілізація та подальше зберігання при мінус 15-25°C. Однак відзначається слабка безпека отриманих таким чином трансплантатів, крім цього алотрансплантати можуть викликати імунологічну реакцію, яка призводить до тромбозу. Тому на сьогоднішній день одним із завдань трансплантології судин є зниження імуногенності алотрансплантатів. Заморожування та низькотемпературне зберігання тканини частково знижують експресію антигенів, а також сприяють усуненню самих антигенів.

Показано, що застосування низьких температур у поєднанні з іонізуючим опроміненням знижує імуногенність ксеногенних артерій та уповільнює швидкість їхньої біодеградації. Отримані результати дозволили розробити методику девіталізації ксеноартерій малого діаметра без використання цитотоксичних хімічних реагентів.

Внаслідок комплексу виконаних робіт виявлено сприятливі характеристики кріоконсервованих девіталізованих ксеноартерій у вигляді відсутності імуногенних реакцій, стенозів та дилатацій, адекватне функціонування протягом 36 місяців.

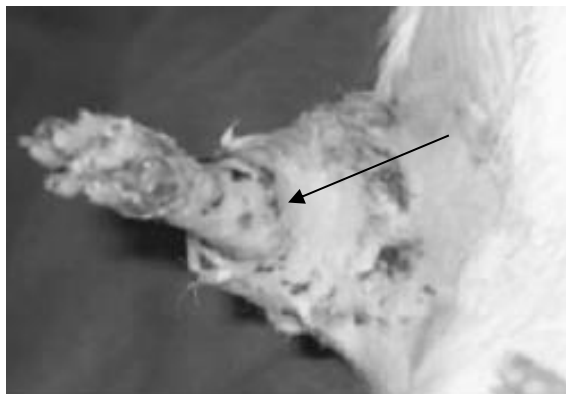
## **8. Кріоконсервування кінцівок**

Відновлення кінцівок, втрачених внаслідок травми, лікування онкологічних захворювань чи корекції вроджених дефектів шляхом трансплантації має велику практичну значимість. Ідея алотрансплантації кінцівок сама по собі не нова, проте широкого застосування ще не знайшла. Зокрема, за період 1998-2015 років було проведено трохи більше ста трансплантацій верхніх кінцівок. Проблеми пов'язані з тим, що для їх трансплантації необхідний прийом реципієнтами потужних імуносупресивних

препаратів. Крім цього, як правило, трансплантація кінцівок не пов'язана зі станами, що загрожують життю, і є хороша альтернатива трансплантації – протезування.

Іншими проблемами є підбір донорів для трансплантації, відбір органу та час його транспортування – процедури, які може бути витрачено багато годин та днів. Тому кріоконсервування кінцівок може стати тим способом, який потенційно дозволить вирішити перераховані вище проблеми.

Існують експериментальні роботи, що показують можливість використання кріоконсервування для зберігання задньої кінцівки щура (рис. 3).



**Рис. 3. Аутотрансплантована задня кінцівка щурів, яка зазнавала кріоконсервування. Стрілкою позначено межу між куксами і трансплантатом.** (З Zengtao Wang, Bo He, Yongzhuang Duan, Yun Shen, Lei Zhu, Xiaolei Zhu and Zhaowei Zhu *Cryopreservation and replantation of amputated rathindlimbs Wangetal . European Journal of Medical Research (2014, 19:28).*

При цьому були використані такі процедури:

1. Промивання ампутованої кінцівки фізіологічним розчином безпосередньо перед кріоконсервуванням.
2. Перфузування кінцівки розчином кріопротектора, що містить 10% ДМСО, 10% ФБС та 5% сахарозу.
3. Поміщення кінцівок у пластикові контейнери та заморожування зі швидкістю 0,3-0,5 град/хв до мінус 40° С подальшим зануренням у рідкий азот.
4. Відігрівання з використанням середовища RPMI 1640, нагрітого до 40° С, в яку поміщають кінцівку безпосередньо з рідкого азоту на 8 хв. Перфузування середовищем RPMI 1640 протягом 15 хв зі швидкістю 50 мл/годину.
5. Трансплантація кінцівки.

## **9. Кріоконсервування ендокринних органів**

Незважаючи на замісну терапію, яка дозволяє значно покращити стан хворого, інтерес до використання трансплантації залоз внутрішньої секреції не згасає. Головною перевагою даного методу є активна участь пересаженої тканини у стабільній та тривалій підтримці фізіологічного рівня гормонів.

Наприклад, при лікуванні гіпогонадізму використовують препарат тестостерон-енантат. Це ефір гормону тестостерону, який використовують для підшкірних ін'єкцій. Концентрації даного препарату в крові протягом декількох днів після введення підвищуються значно вище за фізіологічні і падають набагато нижче до моменту прийому наступної дози. Ці коливання рівня тестостерону можуть призвести до

ослаблення лібідо, а також негативно впливати на кардіоваскулярну систему. Однак такі негативні ефекти можуть бути попереджені за допомогою трансплантації кріоконсервованої тестикулярної тканини або клітин Лейдіга .

Різноманітність методів кріоконсервування ендокринних органів та їх клітин велика, так само як і залоз внутрішньої секреції. Створення низькотемпературних банків може бути фундаментом для подальшої розробки методів трансплантації залоз і впровадження їх у практику. Нижче, як приклади, наведено опис методів кріоконсервування лише деяких із них.

### **9.1. Щитоподібна залоза**

Незважаючи на те, що терапія тиреоїдними гормонами визнана ефективною, пацієнти часто страждають від таких побічних ефектів як депресії, головний біль, порушення серцево-судинної системи. Тому лікування гіпотиреозу, що виник у результаті хірургічного видалення щитоподібної залози внаслідок раку, зобу та ін. за допомогою методу трансплантації може значно покращити якість життя та бути економічно обґрунтованим.

Протокол для кріоконсервування щитоподібної залози:

1. Зрізи щитоподібної залози товщиною 5-7 мм і довжиною 15-20 мм поміщають у фторопластові пакети з консервуючим розчином, що містить 100 мл середовища Хенкса, 50 мг КІ та 12-13 мл ДМСО.
2. Пакети герметизують, і після 10-15 хв експозиції при 0-2° С піддають заморожуванню зі швидкістю 5-7 град/хв до мінус 70° С, а потім до мінус 196° С зі швидкістю 85-100 град/хв.
3. Відігрівають об'єкти на водяній бані при 37-40° С.
4. Трансплантацію здійснюють у підшкірну клітковину передньої черевної стінки.

За результатами експериментальних робіт встановлено, що трансплантація тканини щитоподібної залози сприяє поліпшенню загального стану хворих, відновленню працездатності, зникненню сонливості, повільності, загальмованості, болю в серці, сухості шкіри та слизової оболонки, набряків, надлишкової маси, брадикардії, позитивної динаміки вмісту гормонів у крові, нормалізації показників ліпідного обміну.

### **9.2. Наднирники**

Недостатність надниркових залоз – досить рідкісна патологія, але вона може загрожувати здоров'ю та життю пацієнта. Існує велика кількість препаратів глюко- та мінералокортикоїдів для замісної терапії, проте потреба у стероїдах змінюється протягом доби, тому така терапія не ідеальна. Крім того, наднирник має ще й мозкову частину, відповідальну за синтез катехоламінів. Структурна цілісність цього органу важлива щодо його функціонування.

Єдиних протоколів для кріоконсервування наднирників, схвалених для застосування в клініці, немає. Однак є досвід проведення трансплантації фрагментів фетальних надниркових залоз щурів після їх кріоконсервації з 20% ДМСО. Після трансплантації кріоконсервовані наднирники були здатні подовжувати показник виживання тварин після адреналектомії. При цьому показано зниження імуногенності

фрагментів надниркових залоз після кріоконсервування та алло/сингенної експериментальної трансплантації в ниркову капсулу.

### **9.3. Острівці Лангерганса**

Трансплантація острівців підшлункової залози може розглядатися як один із способів лікування діабету 1-го типу. Однак для компенсації інсулінової недостатності необхідно приблизно 5000 острівців/кг ваги реципієнта, які можна вводити йому в портальну вену. Отримати таку кількість острівців для кожної трансплантації дуже важко, тому кріоконсервування дає можливість накопичення острівців для трансплантації.

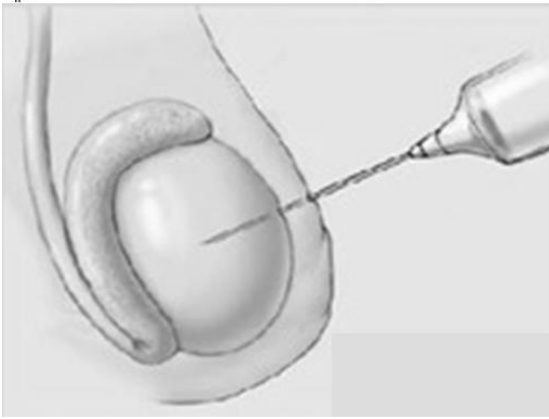
При заморожуванні острівців зазвичай використовують ДМСО у концентрації близько 10%, оскільки вищі кількості мають значну токсичну дію. Тому додатково використовуються й інші кріоконсерванти. Наприклад, розчини трегалози або гідроксиетилкрохмалю. Все це дозволяє зменшити концентрацію ДМСО до 5-6%. Крім того, показана можливість використання 15% розчинів етиленгліколю або поліетиленгліколю.

Трансплантація кріоконсервованих острівців підшлункової залози сприяє усуненню симптомів експериментального діабету, глюкозурії та гіперглікемії, а також нормалізації виділення добового об'єму сечі та ваги тварин.

### **9.4. Чоловічі гонади**

Збереження репродуктивного здоров'я населення та генетичного розмаїття тваринного світу є актуальним завданням сучасної біології та медицини. Найбільш ефективним методом збереження фертильності є кріоконсервування гамет. Кріоконсервування гонад є засобом збереження фертильності при неможливості одержання гамет, гонадотоксичному лікуванні, хірургічній кастрації або тяжких захворюваннях органів репродукції. Основна мета методів кріоконсервування тестикулярної тканини полягає у збереженні клітин-попередників сперматозоїдів. Кріоконсервування гонад є одним із потенційно здатних підходів, що дозволяють відновити фертильність чоловіків. Наприклад, лікування онкопатології у статевонезрілих чоловіків пов'язане з розвитком азооспермії в дорослому стані. При цьому алотрансплантація тканини тестисів може бути підходом, що дозволяє у майбутньому мати дітей. Крім того, трансплантація тестикулярної тканини може бути рекомендована і для пацієнтів, які пройшли курс радіотерапії та трансплантацію кісткового мозку при лікуванні таласемії, ідіопатичної медулярної аплазії, гранулематозу. Пацієнти з травмами яєчка внаслідок аварій, бойових дій також можуть використовувати кріоконсервований матеріал тестикулярної тканини з терапевтичною метою.

Трансплантація цілого кріоконсервованого органу призводить до його відторгнення. Тому існують кілька інших потенційно можливих способів трансплантації: фрагментів тестисів, клітин Лейдіга, кріоконсервованих сперматогоніальних стовбурових клітин тестисів .



#### **Мал. 4. Аспіраційна біопсія яєчка.**

*Відносно проста у виконанні маніпуляція, яку виконують в операційній під місцевою анестезією. Проводиться без розрізу, триває трохи більше 15 хв. За допомогою спеціальної дуже тонкої пункційної голки, яка вводитьься через шкіру мошонки, з яєчка аспірується вміст.*

У деяких випадках єдиною можливістю збереження репродуктивного потенціалу є кріоконсервування біоптату яєчка (рис. 4). Він може бути заморожений у вигляді суспензії герміногенних клітин або у вигляді звивистих насінневих каналців. Тканини або суспензію клітин насичують кріозахисним розчином, заморожують та зберігають у рідкому азоті. Після розморожування проводять аутотрансплантацію герміногенних клітин у тканину сім'яників, при цьому спостерігається відновлення диференціювання сперматогоніїв. Після розморожування насінневих каналців проводять трансплантацію біоптату, після чого ініціюється сперматогенез. При використанні цих методів можливе збереження тестикулярної тканини без втрати здатності до диференціювання сперматогенного епітелію.

Процедури кріоконсервування включають інкубацію фрагментів в середовищі, що містить 1,5-3М ДМСО, гліцерин або пропандіол. Це захисне середовище, як правило, містить ще 0,5М сахарозу, бичачий сироватковий альбумін (5 мг/мл), 20мМ Нерес. Використовують повільний режим охолодження – 0,5-1 град/хв до температури мінус 75°C.

Для кріоконсервування ізольованих клітин Лейдіга щурів використовують 7-20% ДМСО. Заморожують зі швидкістю 1град/хв до мінус 70°C з подальшим зануренням зразків в рідкий азот. Після зберігання зразки відігрівають на водяній бані при 37° С. При трансплантації таких клітин у підшкірну клітковину або під капсулу нирки було показано, що після заморожування-відігрівання клітини зберігали здатність синтезувати та секретувати тестостерон.

Окрему проблему представляє кріоконсервування тестикулярної тканини, одержаної у пацієнтів препубертатного віку, оскільки випадків успішного формування сперматозоїдів після розморожування таких зразків на сьогоднішній день не описано.

### **9.5. Оваріальна тканина**

Основна мета кріоконсервування оваріальної тканини полягає у збереженні клітин-попередників ооцитів. Кріоконсервування оваріальної тканини розглядається як один із способів збереження жіночої фертильності. Відомо, що низка лікувальних протоколів пов'язана із застосуванням препаратів, що знижують можливість отримання здорового потомства. Наприклад, лікування раку пов'язане з хіміо- та радіотерапією, відомою своїм

негативним впливом на структуру яєчника. Тому збереження оваріальної тканини є актуальним.



**Рис 5. Процес інкубації фрагментів оваріальної тканини в розчині кріопротекторів та поміщення їх у контейнер для заморожування.**

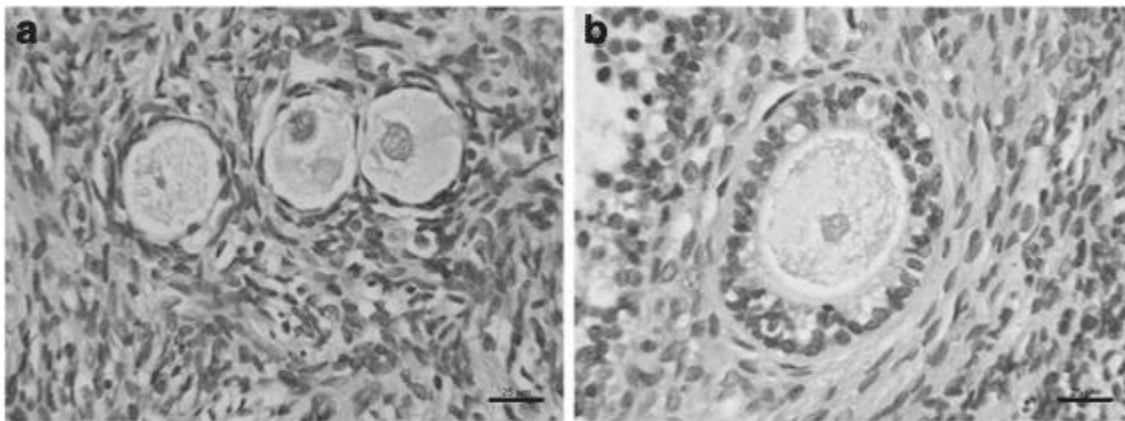
Існує кілька форм зберігання жіночого репродуктивного матеріалу. Наприклад, кріоконсервування зрілих ооцитів. Однак ця процедура вимагає попередньої стимуляції та часу перед забором матеріалу, якого часто не вистачає, коли пацієнту необхідно терміново розпочати лікування у зв'язку з онкопатологією. Крім цього, заморожування ооцитів не підходить пацієнтам, які не досягли статевої зрілості. Інший спосіб, кріоконсервування ембріонів, хоч і відомий високою частотою настання вагітності, зберігає всі недоліки першого підходу. Низькотемпературне консервування оваріальної тканини не вимагає попередньої підготовки пацієнтів, наприклад гормональної стимуляції овуляції, і тому може бути використаний для збереження фертильності статевонезрілих пацієнтів. Після лікування збережена тканина може бути трансплантована. Було показано, що ортотопічно трансплантована кріоконсервована тканина яєчника сприяла відновленню менструального циклу. Результатом аутотрансплантації кріоконсервованих фрагментів яєчників була вагітність та народження дітей.

Не існує загальноприйнятого протоколу для кріоконсервування та методологій трансплантації оваріальної тканини. Як правило, фрагменти оваріальної тканини, кортексу товщиною близько 1-2 мм і з розмірами близько 2x2-5x5 мм поміщають у фосфатно-сольовий буфер (Мал. 5), в який додають кріопротектор (ДМСО, ПД, ЕГ). Додатково середовище містить 10% людську сироватку (часто аутосироватку) або сироватковий людський альбумін 4 мг/мл. Кріоконсервування включає наступні етапи:

1. Інкубація фрагментів тканини в середовищі з кріопротектором при субнульових температурах від 5 до 15 хв.
2. Заморожування об'єктів від 0 до мінус 7 – 8°C зі швидкістю 2 град/хв .
3. Температурна зупинка до 10 хв. для вирівнювання температури по всьому зразку.
4. Охолодження фрагментів тканини від мінус 7 до мінус 40° С зі швидкістю 0,3 град/хв.
5. Заморожування зразків від мінус 40 до мінус 150° С зі швидкістю 10 град/хв .
6. Занурення біооб'єктів у рідкий азот.
7. Відігрівання зразків на водяній бані при 37° С.

Після розморожування понад 70% фолікулів зберігають нормальну будову та можливість відновлення мейозу в ооцитах (Рис.6).





А

Б

**Мал. 6. Мікропрепарат гістологічного зрізу кріоконсервованої тканини яєчника після тривалого зберігання. А – примордіальні фолікули, Б – вторинний фолікул.**

Після відігрівання проводять реімплантацію тканини – ортотопічну (в яєчник) або гетеротопічну (під капсулу нирки, шкіру передпліччя або черевної стінки). Найбільш розробленою є ортотопічна трансплантація, яка часто застосовується.

Таким чином, розроблені методи та методології кріоконсервування репродуктивних тканин та органів дозволяють досягти високої частоти їх виживання. Але, у більшості випадків, роботи мають фундаментальний характер і не знайшли широкого застосування у клінічній практиці. Тим не менш, наукові дослідження в галузі кріоконсервування системи репродукції людини є актуальними та, враховуючи швидкі тенденції розвитку науки, досить перспективними.

Отже, незважаючи на певні досягнення у розробці методів заморожування, кріоконсервування кожного окремого органу або тканини досі залишається окремим складним, але перспективним завданням.

#### **Рекомендована література :**

1. Основи кріобіології та кріомедицини. Підручник для студентів та аспірантів / За редакцією проф. Г.Ф.Жегунова та О.А.Нардіда – Харків, 2019. – 614 с.
2. Грищенко В.І., Чуйко В.О., Пушкар Н.С. Кріоконсервація тканин та клітин ендокринних органів. - К.: Наук. думка, 1993. - 174 с.
3. Білоус А.М., Гордієнко Є.А., Розанов Л.Ф. Заморожування та кріопротекція . - М.: Вищ . Шк., 1987. - 80с.
4. Ersula Rauen , Herbert de Groot. New insights in Cellular and Molecular Mechanisms of Cold Storage Injury. Journal of investigative medicine. V.52., N.5. - 2004.
5. Di Liu, Feng Pan. Advances in Cryopreservation of Organs. J/ HuazhongUnivSciNechnol [Med Sci ] 36(2) – 2016. P/153-161.
6. Abdulla K. Salahudeen Cold ischemic injury transplanted kidneys: нові insights з experimental studies. Am J Physiol Renal Physiol 287: F181-187, 2004.

7. Cameron AM, Barandiaran Cornejo JF. Organ preservation review: history of organ preservation. *Curr Opin Organ Transplant* . 2015 Apr;20(2):146-51.
8. Hameed AM, Hawthorne WJ, Pleass HC. Advances in organ preservation for transplantation. *ANZ J Surg* . 2017 Dec;87(12):976-980.
9. Liu D, Pan F. Advances in cryopreservation of organs. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2016 Apr;36(2):153-161.
10. Fahy GM, Wowk B. Principles of cryopreservation by vitrification. *Methods Mol Biol* . 2015; 1257: 21 -82.
11. Fowler A, Toner M. Cryo i biopreservation . *Ann NY Acad Sci*. 2005 Dec;1066:119-35.

Навчально-методичне видання

**ЖЕГУНОВ** Геннадій Федорович  
**ДЕНИСОВА** Ольга Миколаївна  
**ГЛАДКА** Наталія Іванівна

## **КРІОКОНСЕРВУВАННЯ БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ**

Навчально-методичний посібник

Формат 60x84/16. Гарнітура Times New Roman  
Папір для цифрового друку. Друк ризографічний.

Ум. друк. арк. 0,8.

Наклад \_\_\_ пр.

Державний біотехнологічний університет  
61002, м. Харків, вул. Алчевських, 44