

УДК 547.2:57.083:611.013.85

## СОЗДАНИЕ КРИОЗАЩИТНЫХ СРЕД ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ ЭКСПЛАНТОВ ТКАНИ ПЛАЦЕНТЫ

*И. Б. Мусатова  
О. С. Прокопюк  
В. В. Волина  
В. Ю. Прокопюк*

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, Харьков

*E-mail: bhbyfq@gmail.com*

Получено 07.02.2013

Методом дифференциальной сканирующей калориметрии исследовали фазовые переходы и стеклование многокомпонентных криозащитных сред, включающих NaCl, диметилсульфоксид, сахарозу, поливинилпирролидон, декстран и гидроксиэтилированный крахмал, для криоконсервирования эксплантов плацентарной ткани, а также ее морфологическую сохранность после криоконсервирования в этих средах с целью адекватного подбора компонентов.

Анализ полученных термограмм показал, что во всех многокомпонентных криозащитных средах, замороженных с высокой скоростью, часть раствора переходит в стеклообразное состояние, при нагреве отсутствуют кристаллизация льда из аморфной фазы и плавление областей раствора с эвтектическим составом. Минимальная интенсивность эндотермического эффекта плавления льда, а также наилучшая морфологическая сохранность плацентарной ткани наблюдается в многокомпонентных растворах, содержащих 5% диметилсульфоксида и 6,8% сахарозы или 5% гидроксиэтилированного крахмала в физиологическом растворе. Эти растворы следует считать оптимальными для криоконсервирования эксплантов плацентарной ткани, а их состав рекомендуется использовать при создании сложных криозащитных сред.

**Ключевые слова:** многокомпонентные растворы, фазовые переходы, стеклование, криопротекторы, экспланты плаценты.

Биотехнология создания эксплантов ткани плаценты для медицинского применения основывается главным образом на процессе криоконсервирования, в котором учитываются все факторы, влияющие на сохранность данного биологического объекта. Важнейшим из этих факторов является состав криозащитных сред (КС).

Известно, что физические превращения как при замораживании, так и при нагреве КС вызывают повреждения, снижающие жизнеспособность биологических объектов в процессе криоконсервирования и связанные, в первую очередь, с кристаллообразованием. Считается, что биологические объекты в процессе замораживания, хранения и отогрева в стеклюющихся средах повреждаются минимально [1], поскольку в таких средах интенсивность кристаллообразования снижена в связи с переходом части раствора в стеклообразное (аморфное) состояние. При достаточно быстрой скорости охлаждения КС можно получить в стеклообразном состоянии [2]. Кроме того, в криобиологии используют криопротекторные

вещества, которые при добавлении их в КС способны снижать интенсивность кристаллообразования как внутри, так и вне клеток, создавая более прочные связи с молекулами воды по сравнению со связями их между собой [3–5]. Некоторые из этих веществ способствуют снижению концентрации солей при осмотическом стрессе, что делает минимальным риск повреждения протеиновых структур [6], а также способны образовывать связи со структурными компонентами мембраны клеток, предохраняя их от разрушения кристаллами при замораживании [7–9]. Однако до настоящего времени остается актуальной проблема оптимизации биотехнологии создания криоконсервированных эксплантов ткани плаценты и поиск наиболее приемлемых для этого составов КС.

Целью работы было исследование фазовых и физических состояний многокомпонентных растворов для криоконсервирования эксплантов плацентарной ткани, а также ее морфологической сохранности после замораживания с целью адекватного подбора компонентов.

## Материалы и методы

Ткань плаценты получали во время операции кесарева сечения, транспортировали в стерильной среде DMEM/Ham's F-12 (PAA Laboratories GmbH, Австрия), фрагментировали до размеров 0,5×0,5 см, инкубировали в исследуемой КС в течение 15 мин и перенесли в пластиковые криоампулы производства фирмы NUNC (США) объемом 1,8 мл. Замораживали погружением в жидкий азот со средней скоростью охлаждения 3,3 град/с. Через 30 мин криоампулы с образцами размораживали на водяной бане (температура воды + 40 °С), после чего ткань в течение 15 мин отмывали в среде DMEM.

Состав сред и концентрацию компонентов выбирали, руководствуясь оптимизацией комбинации эндо- и экзоцеллюлярного криопротекторов [10, 11], данными о стабилизирующем действии солей и сахаров в процессе криоконсервирования различных биологических объектов [12, 13], а также современными способами криоконсервирования органов и тканей [14–16].

Для приготовления образцов КС использовали аптечные формы диметилсульфоксида — ДМСО («Димексид», Украина),  $M = 78$ ; физиологического раствора (0,9% -й раствор NaCl, Украина),  $M = 58$ ; поливинилпирролидона — ПВП («Гемодез», Украина),  $M = 8 \pm 2000$ ; декстрана («Полиглюкин», Украина),  $M = 54\ 000\text{--}66\ 000$ ; гидроксипропилированного крахмала — ГЭК («Рефортан» 200/0,5, 6%, Berlin-Chemie, Германия),  $M = 200\ 000$ ; сахарозы марки ХЧ (Украина),  $M = 384$ . Образцы готовили объемно-весовым методом на физрастворе.

Для криоконсервирования эксплантов плацентарной ткани использовали многокомпонентные криозащитные среды:

КС1 — 5% ДМСО в физиологическом растворе (ДМСО, физиологический раствор);

КС2 — 6,8% сахарозы, 5% ДМСО в физиологическом растворе (сахароза, ДМСО, физиологический раствор);

КС3 — 5% ПВП, 5% ДМСО в физиологическом растворе (ПВП, ДМСО, физиологический раствор);

КС4 — 5% декстрана, 5% ДМСО в физиологическом растворе (декстран, ДМСО, физиологический раствор);

КС5 — 5% ГЭК, 5% ДМСО в физиологическом растворе (ГЭК, ДМСО, физиологический раствор).

Образец КС объемом 1 мл помещали в стакан из нержавеющей стали с толщиной стенок 0,1 мм. Охлаждение образцов КС проводили путем погружения в жидкий азот

( $T = -196\text{ °C}$ ) со средней скоростью охлаждения 3,3 град/с. Температуру расстеклования и фазовых переходов определяли на основании термограмм, полученных при нагреве со скоростью  $8,3 \cdot 10^{-3}$  град/с на дифференциальном сканирующем калориметре, разработанном и изготовленном в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины [17].

Морфологическую сохранность исследовали, используя лабораторный тринокулярный микроскоп XSP-139TP (Япония — Китай). Фиксированные препараты эксплантов плацентарной ткани окрашивали гематоксилином и эозином [18].

## Результаты и обсуждение

Методом дифференциальной сканирующей калориметрии исследованы многокомпонентные КС для криоконсервирования эксплантов плацентарной ткани, в состав которых входят NaCl, ДМСО, сахароза, ПВП, декстран и ГЭК.

При размораживании растворов от  $T = -196\text{ °C}$  на термограммах регистрировали пики и скачки теплопоглощения (рис. 1), связанные с изменением фазовых и физических состояний образцов КС. При температуре стеклования ( $T_g$ ) на термограммах всех исследованных растворов наблюдается скачок теплопоглощения (обозначен стрелкой I), соответствующий процессу перехода застеклованных при быстром охлаждении областей образца из твердоаморфного состояния в состояние переохлажденной жидкости и обозначаемый термином «расстеклование» [19].

Расстеклование связано с растормаживанием вращательного и трансляционного движения молекул и является физическим состоянием, а не фазовым переходом [20]. В процессе расстеклования аморфные области раствора, находившиеся в стеклообразном состоянии ниже  $T_g$ , переходят в состояние термодинамически нестабильной переохлажденной жидкости, вязкость системы резко падает.

Для исследованных образцов  $T_g$  имеет следующие значения:  $-125\text{ °C}$  (КС1),  $-104,5\text{ °C}$  (КС2),  $-105\text{ °C}$  (КС3),  $-101,5\text{ °C}$  (КС4),  $-100\text{ °C}$  (КС5). Очевидно, что  $T_g$  растет с увеличением молекулярной массы компонента, добавленного в КС, которая содержит ДМСО на физрастворе и обусловлена характером связей компонентов в растворе.

При дальнейшем повышении температуры (выше  $T_g$ ) в замороженных с высокой скоростью КС, как правило, наблюдается

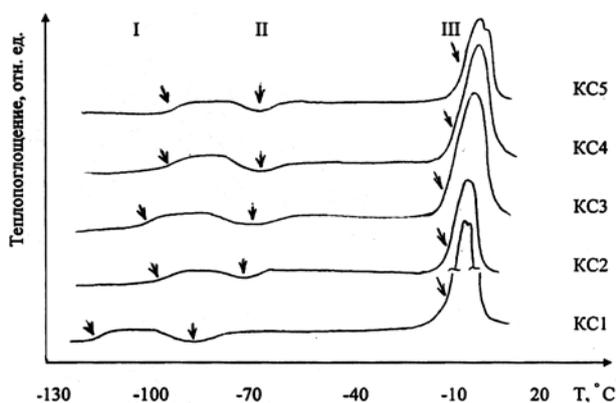


Рис. 1. Термограммы многокомпонентных криозащитных сред при нагреве от  $T = -196\text{ }^{\circ}\text{C}$  (пояснения в тексте)

кристаллизация льда из переохлажденной жидкости, которая может происходить бурно (лавинообразно) [21, 22], провоцируя повреждение биологических объектов. Дальнейший нагрев образца обычно сопровождается эндотермическим эффектом в узком диапазоне температур и соответствует плавлению кристаллов части образца, имеющей эвтектический состав.

Анализ термограмм всех исследованных нами КС показал, что при нагреве от  $T = -196\text{ }^{\circ}\text{C}$  на них отсутствуют пики, соответствующие кристаллизации льда из аморфной фазы и плавлению областей раствора с эвтектическим составом. Отсутствие плавления областей с эвтектическим составом наблюдали при добавлении к фосфатно-солевому буферу и физиологическому раствору малых концентраций криопротекторов [23]. Предполагают, что причина отсутствия указанных термодинамических эффектов в том, что молекулы сахарозы и солей связываются с молекулами ДМСО, «стабилизируя» структуру раствора, в результате чего образование кристаллов ДМСО в системе становится термодинамически невыгодным, и области с эвтектическим составом не образуются [24]. По данным [25], 1 молекула сахарозы способна соединяться водородными связями с 5 молекулами воды, уменьшая таким образом количество свободной воды в растворе и снижая способность КС, содержащих сахарозу, к кристаллообразованию.

Причина отсутствия кристаллизации льда из аморфной фазы и плавления областей с эвтектическим составом в образцах с высокомолекулярными компонентами (ПВП, декстран, ГЭК), по нашему мнению, объясняется их способностью связывать большое количество молекул воды на одну

молекулу вещества и специфической структурой растворов высокомолекулярных веществ [26–28], что приводит к нивелированию указанных термодинамических эффектов.

Таким образом, в исследованных многокомпонентных КС в процессе быстрого замораживания при определенной для каждого образца температуре  $T_g$  появляются области со стеклообразной структурой. Установлено, что процессы плавления областей раствора с эвтектическим составом, а также кристаллообразования из аморфной фазы не развиваются, тем самым устраняются возможные факторы повреждения биообъектов в процессе криоконсервирования.

Все термограммы исследованных образцов имеют небольшой размытый, различный по интенсивности экзотермический пик II в диапазоне температур  $-95\text{ }^{\circ}\text{C} \div -71,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , который отвечает завершению процесса кристаллизации воды и подобно  $T_g$  смещается в область более высоких температур с увеличением молекулярной массы компонента, имеющего более высокую молекулярную массу. Причина явления докристаллизации в том, что кристаллизация воды при быстром охлаждении до температуры жидкого азота не завершается полностью, так как при росте кристаллов льда происходит концентрирование растворенных веществ и возрастает вязкость раствора. Поэтому при нагреве до определенной для каждого образца температуры кристаллизация воды возобновляется.

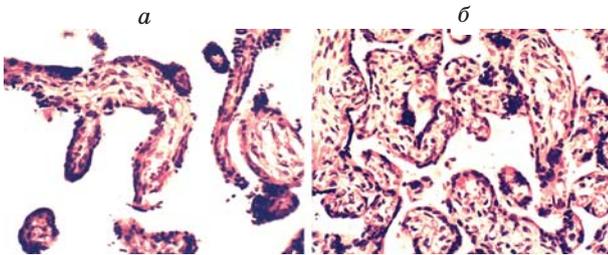
Максимальный эндотермический эффект, соответствующий пику III и отвечающий плавлению льда и переходу образцов в состояние жидкости, наблюдается в исследованных средах при температурах  $-6\text{ }^{\circ}\text{C} \div -7,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Количество поглощенного при плавлении тепла, а следовательно, доля образующихся в процессе охлаждения кристаллов льда в образце меньше в КС2 (сахароза, ДМСО, физиологический раствор) и КС5 (ГЭК, ДМСО, физиологический раствор) по сравнению со средами с другим составом.

Таким образом, из всех исследованных КС для криоконсервирования эксплантов плацентарной ткани многокомпонентные растворы, содержащие помимо ДМСО и физиологического раствора ГЭК или сахарозу, следует считать оптимальными.

Исследованные калориметрическим методом среды применяли для криоконсервирования эксплантов плацентарной ткани. После размораживания оценивали морфоло-

гическую сохранность ее структуры, обеспечивающей межклеточные взаимодействия и целостность синцитиотрофобласта.

Установлено, что структура ткани плаценты, инкубированной в КС1, содержащей ДМСО и NaCl, практически не отличалась от нативной (рис. 2).



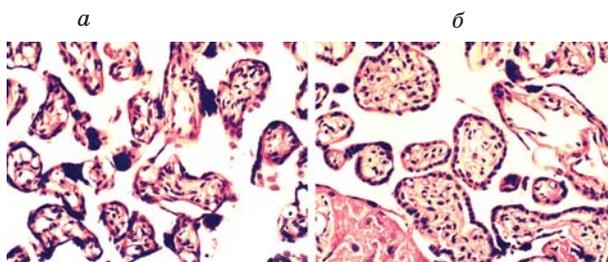
**Рис. 2. Микрофотографии эксплантов плацентарной ткани:**

*a* — нативной; *б* — инкубированной в КС1 (ДМСО, физиологический раствор).

Окрашивание гематоксилином и эозином.  $\times 200$

Гистологически при криоконсервировании эксплантов плацентарной ткани без использования криопротектора наблюдаются сжатие терминальных ворсин, десквамация трофобласта, разрывы соединительной ткани, пикноз ядер ее клеточных элементов (рис. 3, *a*).

Криоконсервирование в среде, содержащей ДМСО, полностью не предотвращало разрушения структуры ткани, наблюдались криоповреждения в виде разрывов и десквамации синцитиотрофобласта (рис. 3, *б*). Это объясняется высокой способностью эмбриональной мезенхимы к накоплению воды и тем, что в процессе криоконсервирования в КС1 доля аморфных областей мала относительно кристаллической части исследуемого образца. Описанные повреждения ткани плаценты могут возникать вследствие кристаллообразования как на этапе замораживания, так и в процессе отогрева.



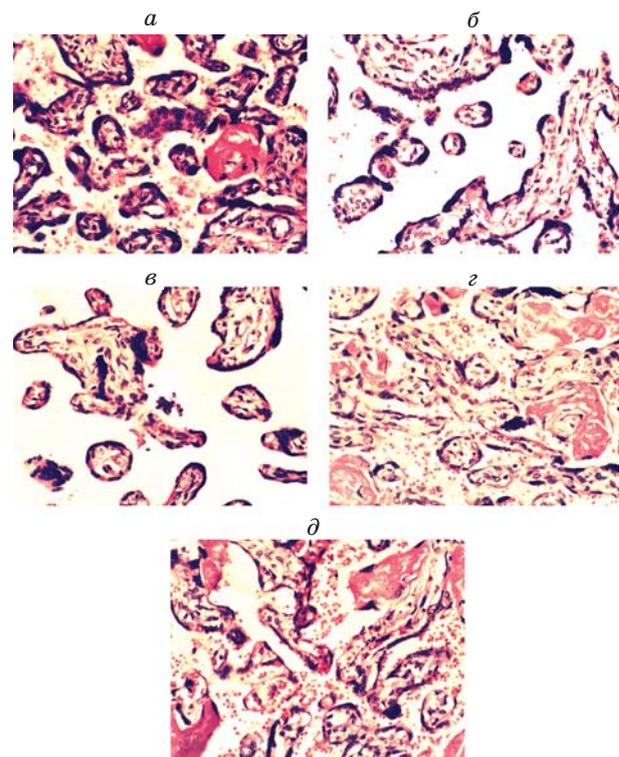
**Рис. 3. Микрофотографии эксплантов плацентарной ткани, криоконсервированных:**

*a* — в физиологическом растворе (контроль); *б* — в КС1 (ДМСО, физиологический раствор). Окрашивание гематоксилином и эозином.  $\times 200$

Для предотвращения кристаллообразования в исследуемые среды добавляли соединения с большой молекулярной массой: ПВП, декстран и ГЭК. Высокомолекулярные вещества, не проникая в клетки, связывают воду в межклеточном пространстве, препятствуя росту кристаллов внеклеточного льда. Определено, что наименьшей токсичностью при инкубировании в исследуемых средах обладают КС, в состав которых кроме ДМСО и физиологического раствора входят сахара или ГЭК (рис. 4).

При гистологическом исследовании препаратов эксплантов плацентарной ткани, инкубированных в КС5, обнаружено, что структуры плаценты изменены незначительно: отслоение синцитиотрофобласта наблюдалось крайне редко, эндотелий кровеносных сосудов сохранен. В целом структура этих образцов практически не отличалась от нативной плаценты (рис. 4, *б*).

При инкубировании эксплантов плацентарной ткани в КС2 наблюдалось некоторое уплотнение структур плаценты, уменьшение



**Рис. 4. Микрофотографии эксплантов плацентарной ткани:**

*a* — нативной, инкубированной в средах; *б* — КС5 (ГЭК, ДМСО, физиологический раствор); *в* — КС2 (сахароза, ДМСО, физиологический раствор); *г* — КС3 (ПВП, ДМСО, физиологический раствор); *д* — КС4 (декстран, ДМСО, физраствор). Окрашивание гематоксилином и эозином.  $\times 200$

интервиллезного пространства за счет сближения мелких терминальных ворсин. Отмечено мукоидное набухание стромы ворсин, ядра синцитиотрофобласта и синцитиальных узлов гиперхромны (рис. 4, в).

Инкубирование эксплантов плацентарной ткани в КС3 приводило к образованию полостей в терминальных ворсинах между коллагеновыми волокнами стромы, дилатации кровеносных сосудов, отслойке синцитиотрофобласта (рис. 4, г). Подобные изменения происходили и при экспозиции эксплантов плацентарной ткани в КС4 (рис. 4, д).

После криоконсервирования эксплантов плацентарной ткани в КС5 отслоение синцитиотрофобласта наблюдалось крайне редко. Ядра синцитиотрофобласта и синцитиальных узлов были несколько увеличены и гиперхромны, так же, как и ядра клеточных элементов стромы. Отмечено сохранение эндотелия кровеносных сосудов (рис. 5, а).

При криоконсервировании эксплантов плацентарной ткани в КС2 структуры плаценты повреждались незначительно, в основном наблюдалось отслоение трофобласта, разрывы мезенхимы (рис. 5, б).

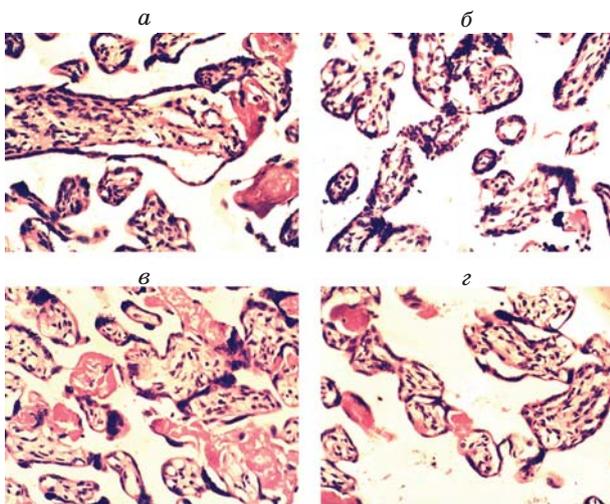


Рис. 5. Микрофотографии эксплантов плацентарной ткани, криоконсервированной в средах:

- а — КС5 (ГЭК, ДМСО, физиологический раствор);  
 б — КС2 (сахароза, ДМСО, физиологический раствор);  
 в — КС3 (ПВП, ДМСО, физиологический раствор);  
 г — КС4 (декстран, ДМСО, физиологический раствор).

Окрашивание гематоксилином и эозином.  $\times 200$

Криоконсервирование эксплантов плацентарной ткани в КС3 приводило к тому, что в терминальных ворсинах хориона коллагеновые волокна стромы часто были фрагментированы, между ними образовывались небольшие полости; кровеносные сосуды в более крупных ворсинах были лишены эндотелия, часто отмечалась отслойка синцитиотрофобласта (рис. 5, г).

При криоконсервировании эксплантов плацентарной ткани в КС4 обнаружено, что терминальные ворсины в большинстве случаев были сжаты, наблюдались истончение и разволокнение коллагеновых волокон соединительнотканной стромы ворсин, в результате чего в них образовывались полости. В мелких ворсинах происходила констрикция гемакапилляров, а в крупных, напротив, дилатация, причем эндотелий сосудов был десквамирован. Местами обнаруживалась десквамация синцитиотрофобласта и пикноз ядер (рис. 5, д).

Таким образом, при криоконсервировании в средах, содержащих, кроме ДМСО и NaCl, ПВП и декстран, структура ткани сохранялась лишь частично. Наибольшая сохранность плацентарной ткани достигалась при введении в состав КС, помимо ДМСО и NaCl, ГЭКа или сахарозы.

По результатам калориметрических исследований во всех многокомпонентных КС, замороженных с высокой скоростью, часть раствора переходит в стеклообразное состояние, при нагреве отсутствуют кристаллизация льда из аморфной фазы и плавление областей раствора с эвтектическим составом. Минимальный эндотермический эффект плавления льда наблюдается в средах, содержащих, кроме NaCl и ДМСО, сахарозу или ГЭК. Криоконсервированием в этих средах достигается наилучшая морфологическая сохранность плацентарной ткани.

Таким образом, для криоконсервирования эксплантов плацентарной ткани оптимальной является многокомпонентная среда, содержащая 5% ДМСО и 6,8% сахарозы или 5% ГЭК в физиологическом растворе, что позволяет рекомендовать композиции этих веществ в качестве компонентов для создания сложных криозащитных сред.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Фаррант Дж. Консервирование и стеклование // Криобиология. — 1988. — № 2. — С. 12–14.
2. Грищенко В. И., Калугин Ю. В., Лучко Н. А. Сверхбыстрые скорости охлаждения и витрифицирующие растворы в криобиологии // Пробл. криобиол. — 1993. — № 3. — С. 3–13.
3. Сведенцов Е. П. Руководство по трансфузионной медицине / Под ред. Е. П. Сведенцова. — Киров, 1999. — 715 с.
4. Goff H. D., Caldwell K. B., Stenley D. W. The Influence of Polysaccharides on the Glass Transition in Frozen Sucrose Solutions and Ice Cream // J. Dairy Sci. — 1993. — N 76. — P. 1268–1277.
5. Грищенко В. И., Чуйко В. А., Пушкарь Н. С. Криоконсервация тканей и клеток эндокринных органов. — К.: Наук. думка, 1993. — 242 с.
6. Цуцаева А. А., Аграненко В. А. Криоконсервирование клеточных суспензий / Под ред. А. А. Цуцаевой. — К.: Наук. думка, 1983 — 240 с.
7. Виноград-Финкель Ф. Р., Киселев А. Е. Актуальные проблемы замораживания крови // Пробл. гематол. перелив. крови. — 1970. — № 4. — С. 3–4.
8. Pushkar N. S., Itkin Yu. A., Bronshtein V. L. On the problem of dehydration and intracellular crystallization during freezing of cell suspension // Cryobiology. — 1976. — V. 13, N 2 — P. 147–152.
9. Смольянинова Е. И., Линник Т. П., Гордиенко О. И. Проницаемость мембран ооцитов мыши для криозащитных веществ ряда диолов и амидов // Цитология. — 2004. — Т. 46, № 9. — С. 855–856.
10. Рамазанов В. В., Бондаренко В. А. Проявление и устранение эффекта «упаковки» в средах с непроникающими и проникающими криопротекторами // Пробл. криобиол. — 2009. — Т. 19, № 3. — С. 312–323.
11. Kuleshova L. L., Shaw J. M., Trounson A. O. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation // Cryobiology. — 2001. — V. 43, N 1. — P. 21–31.
12. Kuleshova L. L., MacFarlane D. R., Trounson A. O., Shaw J. M. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes // Ibid. — 1999. — V. 38, N 2. — P. 119–130.
13. Boutron P., Peyridieu J. F. Reduction in toxicity for red blood cells in buffered solutions containing high concentrations of 2,3-butenediol by trehalose, sucrose, sorbitol or mannitol // Ibid. — 1994. — V. 31. — P. 367–373.
14. Pegg D. E. The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs // Ibid. — 2010. — V. 60, N 3. — P. 36–44.
15. Huppertz J. B., Kivity V., Sammar M. et al. Cryogenic and low temperature preservation of human placental villous explants — a new way to explore drugs in pregnancy disorders // Placenta. — 2011. — N 32. — P. 65–76.
16. Xiao Z., Wang Y., Li L. et al. Needle immersed vitrification can lower the concentration of cryoprotectant in human ovarian tissue cryopreservation // Fert. Steril. — 2010. — V. 94, N 6. — P. 2323–2328.
17. Зинченко А. В., Моисеев В. А. Исследование низкотемпературных фазовых переходов в водных растворах ПЭГ-400 калориметрическим методом // Криобиол. криомед. — 1979. — Вып. 5. — С. 27–30.
18. Меркулов Г. А. Курс патологогистологической техники. — Л.: Медгиз, 1961. — 340 с.
19. Rasmussen D. H., Mc Kenzie A. P. Phase diagram for the system water-dimethylsulfoxide // Nature. — 1968. — V. 220, N 5174. — P. 1315–1317.
20. Ремизова А. А. Фазовые переходы и аномальные явления вблизи точек плавления: Автореф. дис....канд. физ.-мат. наук. — М., 1960. — 18 с.
21. Воротилин А. М., Зинченко А. В., Моисеев В. А., Подопривога Л. П. Механизмы повреждения эритроцитов при размораживании // Криобиология. — 1990. — № 3. — С. 23–27.
22. Зинченко А. В., Моисеев В. А., Овчаренко Ф. Д., Прохвятилов А. И. О фазовых переходах и физических состояниях системы вода-пропандиол // ДАН СССР. — 1983. — Вып. 269, № 1. — С. 144–146.
23. Han B., Bischof J. C. Thermodynamic nonequilibrium phase change behavior and thermal properties of biological solutions for cryobiology applications // J. Biomech. Eng. — 2004. — V. 126, N 2. — P. 196–203.
24. Зинченко А. В., Петренко А. Ю. Низкотемпературные фазовые переходы в среде для криоконсервирования гепатоцитов на основании ДМСО / Физико-химические процессы в криобиологических системах. — Харьков, 1991. — С. 56–60.
25. Schawe J. E. K. A quantitative DSC analysis of the metastable phase behavior of the sucrose-water system // Thermochemica Acta. — 2006. — V. 451, N 1–2. — P. 115–125.
26. Hatakeyama T., Tanaka M., Hatakeyama H. Thermal properties of freezing bound water restrained by polysaccharides // J. Biomater. Sci. Polym. Ed. — 2010. — V. 21, N 14. — P. 1865–1875.

27. Бутров А. В., Борисов А. Ю. Современные синтетические коллоидные плазмозаменяющие растворы в интенсивной терапии острой кровопотери // Консилиум медиком (гастроэнтерология/хирургия). — 2005. — Т. 7, № 6. — С. 472–476.

28. Серов В. Н., Баранов И. И. Растворы гидроксиэтилированного крахмала в акушерско-гинекологической практике // Рос. мед. журн. — 2006. — Т. 14, № 1. — С. 21–25.

### СТВОРЕННЯ КРІОЗАХИСНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ ЗБЕРЕЖЕННЯ ЕКСПЛАНТІВ ТКАНИНИ ПЛАЦЕНТИ

*I. B. Musatova  
O. S. Prokopyuk  
V. V. Volina  
V. Yu. Prokopyuk*

Інститут проблем кріобіології  
та кріомедицини НАН України, Харків

*E-mail: bhbyfq@gmail.com*

Методом диференційної сканувальної калориметрії досліджували фазові переходи та склування багатокомпонентних кріозахисних середовищ, що містять NaCl, диметилсульфоксид, сахарозу, полівінілпіролідон, декстран і гідроксіетильований крохмаль, для кріоконсервування експлантів плацентарної тканини, а також її морфологічну збереженість після кріоконсервування в цих середовищах з метою адекватного підбору компонентів.

Аналіз одержаних термограм показав, що в усіх багатокомпонентних кріозахисних середовищах, заморожених з високою швидкістю, частина розчину переходить у склоподібний стан, під час нагрівання відсутні кристалізація льоду з аморфної фази і плавлення ділянок розчину з евтектичним складом. Мінімальна інтенсивність ендотермічного ефекту плавлення льоду, а також найкраща морфологічна збереженість плацентарної тканини спостерігається в багатокомпонентних розчинах, що містять 5% диметилсульфоксиду та 6,8% сахарози або 5% гідроксіетильованого крохмалу у фізіологічному розчині. Ці розчини слід вважати оптимальними для кріоконсервування експлантів плацентарної тканини, а їхній склад доцільно використовувати з метою створення складних кріозахисних середовищ.

**Ключові слова:** багатокомпонентні розчини, фазові переходи, склування, кріопротектори, експланти плаценти.

### CREATION OF THE OPTIMAL MEDIA FOR PLACENTAL TISSUE EXPLANTS CRYOPRESERVATION

*I. B. Musatova  
O. S. Prokopyuk  
V. V. Volina  
V. Yu. Prokopyuk*

Institute for Problems of Cryobiology  
and Cryomedicine of National Academy  
of Sciences of Ukraine, Kharkiv

*E-mail: bhbyfq@gmail.com*

Phase transitions and vitrification of multi-component cryoprotective media including NaCl, dimethyl sulfoxide, sucrose, polyvinylpyrrolidone, dextran and hydroxyethyl starch for cryopreservation of explants of placental tissue as well as its morphological integrity after cryopreservation in these media with the aim of adequate selection of the components were studied by differential scanning calorimetry.

Analysis of the obtained thermograms has shown that in all multicomponent cryoprotective media, frozen with a high rate, the part of the solution transforms into a vitrified state during warming ice crystallization from amorphous phase and melting of solution area with eutectic composition are absent. Minimal intensity of endothermal effect of ice melting as well as the highest morphological integrity of placental tissue is observed in multicomponent solutions containing 5% dimethyl sulfoxide and 6,8% sucrose or 5% hydroxyethyl starch in physiological solution. These media should be considered as optimal ones for cryopreservation of placental tissue explants, and their composition is recommended to be used when designing complex cryoprotective media.

**Key words:** multicomponent solutions, phase transitions, vitrification, cryoprotectants, placental explants.