

DOI: <https://doi.org/10.26565/2313-6693-2026-58-09>
УДК: 57.085.2:57.085.3:615.015.6:615.37:612.017



Біотехнологічні стратегії лізису клітин і криогенного ушкодження мембран у технології отримання тканинних криоекстрактів та секреторних продуктів як джерел ендогенних регуляторних молекул для модулювання тканинної репарації

Студент В.О.^{1,2},  <https://orcid.org/0000-0002-0928-2695>, e-mail: student.volodymyr@gmail.com

Дробнер І.Г.^{1,3},  <https://orcid.org/0009-0003-4753-7366>, e-mail: drobneri@gmail.com

Гладких Ф.В.^{1,4},  <https://orcid.org/0000-0001-7924-4048>, e-mail: fedir.hladkykh@gmail.com

Лядов Д.А.¹,  <https://orcid.org/0009-0001-1040-9737>, e-mail: danil.liadov.work@gmail.com

Волобуєв Д.О.¹,  <https://orcid.org/0009-0000-4580-0667>, e-mail: danalex999@ukr.net

¹Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна
Міністерства освіти і науки України, Харків, Україна

²Товариство з обмеженою відповідальністю
«Медичний центр 3D Діагностика», Львів, Україна

³Комунальне некомерційне підприємство «Хмельницький протипухлинний центр»
Хмельницької обласної ради, Хмельницький, Україна

⁴Державна установа «Інститут медичної радіології та онкології імені С.П. Григор'єва
Національної академії медичних наук України», Харків, Україна

Biotechnological strategies for inducing cell lysis and cryogenic membrane damage in the production of tissue cryoextracts and secretory products serve as a source of endogenous regulatory molecules for the modulation of tissue repair

Student V.O.^{1,2},  <https://orcid.org/0000-0002-0928-2695>, e-mail: student.volodymyr@gmail.com

Drobner I.H.^{1,3},  <https://orcid.org/0009-0003-4753-7366>, e-mail: drobneri@gmail.com

Hladkykh F.V.^{1,4},  <https://orcid.org/0000-0001-7924-4048>, e-mail: fedir.hladkykh@gmail.com

Liadov D.A.¹,  <https://orcid.org/0009-0001-1040-9737>, e-mail: danil.liadov.work@gmail.com

Volobuev D.O.¹,  <https://orcid.org/0009-0000-4580-0667>, e-mail: danalex999@ukr.net

¹V.N. Karazin Kharkiv National University
of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

²Limited Liability Company
«Center of Medical 3D Diagnostics», Lviv, Ukraine

³Communal Non-Commercial Enterprise «Khmelnyskyi Regional Antitumor Center»
of the Khmelnytskyi Regional Council, Khmelnytskyi, Ukraine

⁴State Organization «Grigoriev Institute for medical Radiology and Oncology
of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv, Ukraine

Ключові слова:

безклітинні криоконсервовані біологічні засоби, біотехнологія, заморожування, лізис клітин, низька температура.

РЕЗЮМЕ

Актуальність. Одержання біологічноактивних безклітинних терапевтичних продуктів на основі тканинних криоекстрактів потребує оптимізації технологій лізису клітин та контролю криогенного ушкодження мембран, оскільки від цих процесів залежить збереження структури природних регуляторних молекул і відтворюваність їх біологічної дії. Зростаючий інтерес до безклітинних підходів у регенеративній медицині зумовлює необхідність систематизації сучасних стратегій руйнування клітин і аналізу їхнього впливу на якість терапевтичних екстрактів.

Мета роботи – узагальнити та критично проаналізувати сучасні біотехнологічні стратегії лізису клітин і механізми криогенного ушкодження мембран за літературними даними, оцінити їх вплив на вивільнення та збереження ендогенних регуляторних молекул, визначити оптимальні умови отримання високоякісних тканинних криоекстрактів, охарактеризувати їхню молекулярну й функціональну стабільність, а також обґрунтувати перспективи стандартизації безклітинних біопрепаратів для застосування у регенеративній медицині.

Для кореспонденції:

Гладких Федір Володимирович
Державна установа «Інститут
медичної радіології та онкології імені
С.П. Григор'єва Національної академії
медичних наук України», відділ променевої
патології та паліативної медицини;
вул. Григорія Сковороди, буд. 82,
м. Харків, Україна, 61024;
e-mail: fedir.hladykh@gmail.com

© Студент В.О., Дробнер І.Г.,
Гладких Ф.В., Лядов Д.А.,
Волобуєв Д.О., 2026

Матеріали та методи. Пошук публікацій здійснено у базах даних PubMed, Clinical Key Elsevier, Cochrane Library, eBook Business Collection та Google Scholar. Пошук проводили за ключовими словами, далі виконували відбір за змістом резюме та повнотекстовим аналізом. До вибірки включали праці, що містили сучасні відомості про методи лізису, криогенне ушкодження та отримання тканинних екстрактів і відповідали принципам доказової медицини.

Результати. Встановлено, що механічні, фізичні, хімічні та ферментативні методи лізису суттєво відрізняються за інтенсивністю впливу на клітинні структури, рівнем збереження білків, пептидів, ліпідів та низькомолекулярних компонентів, а також за чистотою отриманого екстракту. Криогенний лізис забезпечує мінімальну деградацію чутливих молекул, пригнічення ендогенних ферментів та стабільність нативної структури біоактивних речовин, що робить його найбільш придатним для отримання стандартизованих терапевтичних продуктів. Інші методи демонструють вищу ефективність руйнування мембран, але супроводжуються ризиками термомеханічних або хімічних ушкоджень, утворенням домішок та варіабельністю складу. Проаналізовано значення криогенних механізмів, включно з фазовими переходами ліпідів, осмотичними зсувами та льодоутворенням, які визначають вивільнення внутрішньоклітинних регуляторних молекул і формують біоактивний профіль криоекстрактів.

Висновки. Криогенний лізис є найбільш збалансованим підходом для отримання високоякісних тканинних криоекстрактів, оскільки поєднує повноцінне руйнування клітин з максимальним збереженням біологічної активності молекул. Стандартизація методів лізису є ключовою умовою підвищення ефективності та безпечності безклітинних регенеративних технологій.

Для цитування:

Студент В.О., Дробнер І.Г., Гладких Ф.В., Лядов Д.А., Волобуєв Д.О. Біотехнологічні стратегії лізису клітин і криогенного ушкодження мембран у технології отримання тканинних криоекстрактів та секреторних продуктів як джерел ендогенних регуляторних молекул для модулювання тканинної репарації. *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія Медицина.* 2026. Т. 34. № 1 (58). С. 122-151. DOI: <https://doi.org/10.26565/2313-6693-2026-58-09>

Keywords:

acellular cryopreserved biological products, biotechnology, freezing, cell lysis, low temperature.

For correspondence:

Hladykh Fedir Volodymyrovych
State Organization «Grigoriev Institute for
medical Radiology and Oncology of the
National Academy of Medical Sciences
of Ukraine», Department of Radiation
Pathology and Palliative Medicine;
82 Hryhoriia Skovorody Str., Kharkiv,
Ukraine, 61024;
e-mail: fedir.hladykh@gmail.com

© Student V.O., Drobner I.H.,
Hladykh F.V., Liadov D.A.,
Volobuev D.O., 2026

ABSTRACT

Background. The production of biologically active cell-free therapeutic products based on tissue cryoextracts requires the optimization of cell lysis technologies and control of cryogenic membrane injury, as these processes determine the preservation of endogenous regulatory molecules and the reproducibility of their biological effects. The growing interest in cell-free approaches in regenerative medicine highlights the need to systematize modern strategies of cell disruption and to analyze their influence on the quality of therapeutic extracts.

Purpose – to summarize and critically analyze current biotechnological strategies of cell lysis and the mechanisms of cryogenic membrane injury based on literature data, to evaluate their impact on the release and preservation of endogenous regulatory molecules, to identify optimal conditions for obtaining high-quality tissue cryoextracts, to characterize their molecular and functional stability, and to substantiate the prospects for standardizing cell-free biological products for use in regenerative medicine.

Materials and Methods. The literature search was performed in PubMed, Clinical Key Elsevier, Cochrane Library, eBook Business Collection, and Google Scholar. The search was conducted using relevant keywords, followed by screening of article abstracts and full-text evaluation. Publications were included if they contained up-to-date data on methods of cell lysis, cryogenic membrane injury, and the production of tissue extracts, and if they adhered to the principles of evidence-based medicine.

Results. It was established that mechanical, physical, chemical, and enzymatic methods of cell lysis differ markedly in the intensity of their impact on cellular structures, in their ability to preserve proteins, peptides, lipids, and low-molecular-weight components, as well as in the purity of the resulting extract. Cryogenic lysis ensures minimal degradation of sensitive molecules, suppression of endogenous enzymatic activity, and enhanced stability of the native structure of bioactive substances, making it the most suitable approach for producing standardized therapeutic products. Other methods demonstrate higher membrane-disrupting efficiency but are associated with risks of thermomechanical or chemical damage, contaminant formation, and variability in extract composition. The significance of cryogenic mechanisms including lipid phase transitions, osmotic shifts, and intracellular ice formation was analyzed, as they determine the release of intracellular regulatory molecules and shape the bioactive profile of cryoextracts.

Conclusions. Cryogenic lysis represents the most balanced approach for obtaining high-quality tissue cryoextracts, as it combines effective cell disruption with maximal preservation of biological activity. The standardization of lysis methods is a key prerequisite for improving the efficacy and safety of cell-free regenerative technologies.

For citation:

Student VO, Drobner IH, Hladkykh FV, Liadov DA, Volobuev DO. Biotechnological strategies for inducing cell lysis and cryogenic membrane damage in the production of tissue cryoextracts and secretory products serve as a source of endogenous regulatory molecules for the modulation of tissue repair. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series Medicine*. 2026;34(1(58)):122-151. DOI: <https://doi.org/10.26565/2313-6693-2026-58-09>

ВСТУП

Сучасні напрями регенеративної медицини дедалі більше орієнтуються на використання технологій, що дозволяють отримувати високоактивні біологічні продукти без застосування життєздатних клітин [1]. Попит на такі підходи зумовлений низкою факторів: імунологічними та онкологічними ризиками клітинної терапії, складністю контролю фенотипу та життєздатності клітинних популяцій, вимогами до криозбереження й логістики, а також потребою у стандартизованих і відтворюваних терапевтичних продуктах. На цьому фоні стає очевидною необхідність створення біотехнологічних платформ, які поєднують високу біологічну активність із простотою виробництва, мінімальними вимогами до зберігання та високою безпекою. Одним із найбільш перспективних рішень у цьому напрямі є отримання тканинних криоекстрактів та клітинних екстрактів, що містять широкий спектр ендогенних регуляторних молекул – пептидів, білків, низькомолекулярних метаболітів, сигнальних молекул та структурних компонентів позаклітинного матриксу [2].

Отримання таких екстрактів значною мірою залежить від ефективності й контрольованості лізису клітин, а також від особливостей криогенного ушкодження мембран, яке виникає під час заморожування та відтавання тканин [3]. Механізми криопошкодження – утворення позаклітинного та внутрішньоклітинного льоду, фазові переходи ліпідів мембран, осмотичні зсуви, зміни у водному балансі та механічні деформації – створюють унікальні умови для руйнування клітинних структур без застосування агресивних хімічних та термічних методів [4]. Це забезпечує збереження просторової організації та функціональної активності багатьох біомолекул, які у звичайних умовах швидко деградують під впливом протеолізу, оксидації або механічного ушкодження. Таким чином, криогенна обробка тканин не лише сприяє руйнуванню клітин, але й створює щадне середовище, у якому вдається зберегти нативний профіль біоактивних сполук.

Паралельно з цим активно розвивається напрям комбінованих біотехнологічних стратегій лізису, що включають механічні, фізичні, хімічні, ферментативні та мікрофлюїдні технології. Кожна з них має власні переваги та обмеження, а їх раціональне використання визначає молекулярний склад і терапевтичний потенціал екстракту [5]. Механічні методи (гомогенізація високого тиску, bead-milling) забезпечують високий рівень руйнування клітин, але супроводжуються ризиком локального перегрівання й часткової денатурації білків [6]. Фізичні підходи, зокрема ультразвукова та гідродинамічна кавітація, дозволяють інтенсивно руйнувати клітини, однак за надмірних режимів спричиняють оксидативні зміни молекул [7]. Ферментативний лізис вирізняється селективністю, але потребує ретельного очищення екстракту від

INTRODUCTION

Modern trends in regenerative medicine are increasingly focused on the use of technologies that allow highly active biological products to be obtained without the use of viable cells [1]. The demand for such approaches is driven by a number of factors: the immunological and oncological risks of cell therapy, the complexity of controlling the phenotype and viability of cell populations, cryopreservation and logistics requirements, and the need for standardized and reproducible therapeutic products. Against this backdrop, there is a clear need to create biotechnological platforms that combine high biological activity with ease of production, minimal storage requirements, and high safety. One of the most promising solutions in this direction is the production of tissue cryo-extracts and cell extracts containing a wide range of endogenous regulatory molecules – peptides, proteins, low-molecular-weight metabolites, signaling molecules, and structural components of the extracellular matrix [2].

The production of such extracts largely depends on the efficiency and controllability of cell lysis, as well as on the characteristics of cryogenic membrane damage that occurs during tissue freezing and thawing [3]. The mechanisms of cryodamage – the formation of extracellular and intracellular ice, phase transitions of membrane lipids, osmotic shifts, changes in water balance, and mechanical deformations – create unique conditions for the destruction of cell structures without the use of aggressive chemical and thermal methods [4]. This ensures the preservation of the spatial organization and functional activity of many biomolecules, which under normal conditions rapidly degrade under the influence of proteolysis, oxidation, or mechanical damage. Thus, cryogenic tissue treatment not only promotes cell destruction but also creates a gentle environment in which the native profile of bioactive compounds can be preserved.

At the same time, combined biotechnological lysis strategies are actively being developed, including mechanical, physical, chemical, enzymatic, and microfluidic technologies. Each of them has its own advantages and limitations, and their rational use determines the molecular composition and therapeutic potential of the extract [5]. Mechanical methods (high-pressure homogenization, beadmilling) provide a high level of cell destruction, but are accompanied by the risk of local overheating and partial denaturation of proteins [6]. Physical approaches, in particular ultrasonic and hydrodynamic cavitation, allow for intensive cell destruction, but under excessive conditions cause oxidative changes in molecules [7]. Enzymatic lysis is selective, but requires thorough purification of the extract from residual enzymes. Chemical methods ensure complete extraction, but can cause complete protein denaturation or leave toxic impurities [5, 8]. That is why

залишкових ферментів. Хімічні методи забезпечують повноцінну екстракцію, проте можуть викликати повну денатурацію білків або залишати токсичні домішки [5, 8]. Саме тому зростає інтерес до криогенного лізису як найбільш збалансованого підходу з погляду збереження біологічної активності компонентів.

У біотехнологіях отримання тканинних екстрактів криогенний лізис відіграє ключову роль, адже дозволяє уникнути автолізу й деградації під час підготовки зразка. При температурах $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ і нижче активність протеаз, нуклеаз і ліпаз істотно знижується, що забезпечує значно вищу стабільність пептидів, білків, екзосом, фрагментів клітинного матриксу та інших структурно чутливих компонентів. Це створює сприятливі умови для формування екстрактів, у яких збережено нативний молекулярний профіль тканини, включно з унікальними тканинними сигнальними молекулами, що беруть участь у регуляції запалення, ангиогенезу, імунної відповіді та репаративних процесів [9, 10].

З іншого боку, розуміння механізмів криошкодження й лізису логічно пов'язане з ширшим контекстом безклітинних регенеративних технологій, до яких належать також секретом клітин та екзосомальні препарати. У сучасних дослідженнях показано, що низка терапевтичних ефектів мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) зумовлена не їх диференціаційним потенціалом, а саме вивільненням біоактивних молекул у вигляді секретому [11, 12]. Це стало підґрунтям для розвитку безклітинних терапевтичних платформ, які виключають ризики, пов'язані з проліферацією, онкогенністю та імунологічною несумісністю клітин. Тканинні криоекстракти та клітинні екстракти, отримані внаслідок фізичного руйнування клітин, за своєю природою є більш комплексними, ніж очищені екзосоми чи кондиціоновані середовища: вони містять як цитозольні, так і мембранні компоненти, що дозволяє відтворювати широкий спектр регуляторних ефектів [13].

Сукупні експериментальні дані демонструють, що клітинні та тканинні екстракти здатні модулювати запалення, зменшувати оксидативний стрес, покращувати ангиогенез і стимулювати ремоделювання матриксу. Відомо, що екстракти плаценти, селезінки, печінки, серцевої тканини та інших органів мають виражені цитопротекторні, імуномодуляторні та репаративні властивості [10, 14, 15, 16]. Подібні ефекти описані також для лізованих препаратів з МСК, клітин кісткового мозку, жирової тканини, нервових тканин та навіть для екстрактів ембріональних стовбурових клітин. Це робить клітинні екстракти потенційно універсальною платформою для терапії широкого спектра патологічних станів – від ішемічного ураження мозку або міокарда до променевого ушкодження, нейродегенеративних процесів, системного запалення та пошкодження епітеліальних бар'єрів.

Попри значний клінічний потенціал, стандартизація методів отримання криоекстрактів залишається одним із найменш розроблених аспектів біомедичних технологій. Існують суттєві відмінності між підходами до підготовки тканин, протоколами заморожування-відтавання, режимами лізису, методами фільтрації та очищення [17]. Відповідно, різняться і молекулярний

there is growing interest in cryogenic lysis as the most balanced approach in terms of preserving the biological activity of components.

Cryogenic lysis plays a key role in biotechnology for obtaining tissue extracts, as it prevents autolysis and degradation during sample preparation. At temperatures of $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ and below, the activity of proteases, nucleases, and lipases is significantly reduced, which ensures much higher stability of peptides, proteins, exosomes, cell matrix fragments, and other structurally sensitive components. This creates favorable conditions for the formation of extracts that preserve the native molecular profile of the tissue, including unique tissue signaling molecules involved in the regulation of inflammation, angiogenesis, immune response, and reparative processes [9, 10].

On the other hand, understanding the mechanisms of cryodamage and lysis is logically linked to the broader context of cell-free regenerative technologies, which also include cell secretions and exosomal preparations. Recent studies have shown that a number of therapeutic effects of mesenchymal stem cells (MSCs) are due not to their differentiation potential, but to the release of bioactive molecules in the form of secretions [11, 12]. This has become the basis for the development of cell-free therapeutic platforms that eliminate the risks associated with proliferation, oncogenicity, and immunological incompatibility of cells. Tissue cryoextracts and cell extracts obtained as a result of physical destruction of cells are inherently more complex than purified exosomes or conditioned media: they contain both cytosolic and membrane components, which allows them to reproduce a wide range of regulatory effects [13].

Cumulative experimental data demonstrate that cell and tissue extracts are capable of modulating inflammation, reducing oxidative stress, improving angiogenesis, and stimulating matrix remodeling. It is known that extracts from the placenta, spleen, liver, heart tissue, and other organs have pronounced cytoprotective, immunomodulatory, and reparative properties [10, 14, 15, 16]. Similar effects have also been described for lysed preparations from MSCs, bone marrow cells, adipose tissue, nerve tissue, and even embryonic stem cell extracts. This makes cell extracts a potentially universal platform for the treatment of a wide range of pathological conditions, from ischemic brain or myocardial damage to radiation damage, neurodegenerative processes, systemic inflammation, and damage to epithelial barriers.

Despite its significant clinical potential, the standardization of cryo-extract preparation methods remains one of the least developed aspects of biomedical technology. There are significant differences between approaches to tissue preparation, freezing-thawing protocols, lysis modes, filtration and purification methods [17]. Accordingly, the molecular composition of the final products also varies, which complicates the comparison of results and slows down the development of standardized therapeutic agents. Currently, particular attention is being paid to the optimal combination of cryogenic lysis with additional methods of membrane destruction, as well as to the assessment of how different lysis strategies affect the preservation of proteins, peptides, exosomes, nucleic acids, and low-molecular-weight metabolites.

склад кінцевих продуктів, що ускладнює порівняння результатів та гальмує розробку стандартизованих терапевтичних засобів. Наразі особливу увагу приділяють питанням оптимального поєднання криогенного лізису з додатковими методами руйнування мембран, а також оцінці того, як різні стратегії лізису впливають на збереження білків, пептидів, екзосом, нуклеїнових кислот і низькомолекулярних метаболітів.

Критично важливим є також питання безпечності: залишкові хімічні реагенти, продукти деградації біомолекул або надлишкові концентрації внутрішньоклітинного детриту можуть знижувати біоактивність або викликати небажані ефекти *in vivo*. Тому вибір оптимального методу лізису має враховувати не лише ефективність вивільнення компонентів, але й їх подальшу біологічну активність, стабільність і чистоту.

У цьому контексті особливої актуальності набуває системний аналіз сучасних стратегій лізису клітин та механізмів криогенного ушкодження з метою визначення найбільш ефективних технологічних рішень для отримання терапевтичних тканинних криоекстрактів. Важливим науковим завданням є також визначення ключових груп біоактивних молекул, які зберігаються під час криогенного лізису, та оцінка їх потенціалу як ендогенних модулювальних факторів тканинної репарації.

Таким чином, актуальність даної роботи зумовлена необхідністю оптимізації та стандартизації біотехнологічних підходів до лізису клітин і криогенного ушкодження мембран для отримання високоякісних тканинних криоекстрактів, що містять природні регуляторні молекули з вираженим репаративним потенціалом. Проведений аналіз є важливим кроком до формування науково обґрунтованих принципів виробництва безклітинних терапевтичних продуктів, здатних підвищити ефективність регенеративної медицини та відкрити нові можливості для клінічного застосування.

Мета роботи – узагальнити та критично проаналізувати сучасні біотехнологічні стратегії лізису клітин і механізми криогенного ушкодження мембран за літературними даними, оцінити їх вплив на вивільнення та збереження ендогенних регуляторних молекул, визначити оптимальні умови отримання високоякісних тканинних криоекстрактів, охарактеризувати їхню молекулярну й функціональну стабільність, а також обґрунтувати перспективи стандартизації безклітинних біопрепаратів для застосування у регенеративній медицині.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Підбір публікацій виконано за базами даних PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), Clinical Key Elsevier (<https://www.clinicalkey.com>), Cochrane Library (<https://www.cochranelibrary.com/>), eBook Business Collection (<https://www.ebsco.com/>) та Google Scholar (<https://scholar.google.com/>), у яких висвітлювалися відомості про сучасні біотехнологічні стратегії лізису клітин, механізми криогенного ушкодження мембран, вплив низькотемпературних факторів на вивільнення ендогенних регуляторних молекул, а також особливості отримання та стабільності тканинних криоекстрактів і безклітинних біопрепаратів.

Safety is also a critical issue: residual chemical reagents, biomolecule degradation products, or excessive concentrations of intracellular debris can reduce bioactivity or cause undesirable effects *in vivo*. Therefore, the choice of the optimal lysis method should take into account not only the efficiency of component release, but also their subsequent biological activity, stability, and purity.

In this context, a systematic analysis of modern cell lysis strategies and cryogenic damage mechanisms is particularly relevant in order to identify the most effective technological solutions for obtaining therapeutic tissue cryoextracts. Another important scientific task is to identify key groups of bioactive molecules that are preserved during cryogenic lysis and to evaluate their potential as endogenous modulators of tissue repair.

Thus, the relevance of this work is determined by the need to optimize and standardize biotechnological approaches to cell lysis and cryogenic membrane damage for obtaining high-quality tissue cryoextracts containing natural regulatory molecules with pronounced reparative potential. The analysis is an important step towards the formation of scientifically sound principles for the production of cell-free therapeutic products capable of increasing the effectiveness of regenerative medicine and opening up new opportunities for clinical application.

Objective – is to summarize and critically analyze modern biotechnological strategies for cell lysis and mechanisms of cryogenic membrane damage based on literature data, to evaluate their impact on the release and preservation of endogenous regulatory molecules, to determine the optimal conditions for obtaining high-quality tissue cryoextracts, characterize their molecular and functional stability, and justify the prospects for standardizing cell-free biological products for use in regenerative medicine.

MATERIALS AND METHODS OF RESEARCH

The selection of publications was performed using the PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) and Clinical Key Elsevier (<https://www.clinicalkey.com>), Cochrane Library (<https://www.cochranelibrary.com/>), eBook Business Collection (<https://www.ebsco.com/>) and Google Scholar (<https://scholar.google.com/>), which provided information on modern biotechnological strategies for cell lysis, mechanisms of cryogenic membrane damage, the influence of low-temperature factors on the release of endogenous regulatory molecules, as well as the peculiarities of obtaining and stabilizing tissue cryoextracts and cell-free biological preparations.

На першому етапі проводили пошук літературних джерел за ключовими словами: *лізис клітин, криогенний лізис, холодове ушкодження мембран, заморожування, криоекстракт, тканинні екстракти, регуляторні пептиди, безклітинні криоконсервовані засоби, механічний лізис, хімічний лізис, ферментативний лізис, біотехнології лізису, регенеративна медицина*.

На другому етапі вивчали резюме статей та виключали публікації, які не відповідали критеріям дослідження або містили недостатньо даних щодо механізмів лізису, криогенного ушкодження чи характеристик криоекстрактів.

На третьому етапі аналізували повні тексти відібраних статей на відповідність визначеним критеріям включення та оцінювали релевантність методичних підходів, детальність опису процесів лізису й криошкодження, а також інформативність щодо складу та властивостей біоактивних молекул у криоекстрактах.

Критеріями включення публікацій до вибірки, що підлягала контент-аналізу, були:

1. висвітлення сучасних відомостей щодо біотехнологічних методів лізису клітин, механізмів холодового та криогенного ушкодження мембран, а також отримання й біологічних властивостей тканинних криоекстрактів і безклітинних біопрепаратів;

2. відповідність досліджень ключовим засадам доказової медицини, включно з чіткістю методів, відтворюваністю результатів та якістю опису експериментальних процедур;

3. відкритий доступ до повнотекстової статті та достатність інформації для проведення систематичного контент-аналізу.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Терапевтичні тканинні екстракти (зокрема криоекстракти) – такі як препарати на основі плаценти, селезінки, серця, печінки та інших органів – становлять окремий напрямок сучасних біотехнологій, спрямованих на отримання комплексів природних біорегуляторів із вираженою відновлювальною, імунomodулювальною, цитопротекторною та репаративною активністю. Їхній клінічний потенціал визначається біологічною цінністю нативних молекулярних структур: пептидів, ферментів, гормоноподібних факторів, низькомолекулярних метаболітів, нуклеотидів, фрагментів клітинної матриці та сигнальних молекул. Збереження цих сполук у біологічно активному стані є ключовим критерієм якості терапевтичного препарату [18, 19, 20].

Виробництво таких біотехнологічних засобів ґрунтується на принципах низькотемпературної дезінтеграції, яка дозволяє максимально зберегти структурну та функціональну активність тканинних компонентів. Криогенна обробка забезпечує руйнування клітинних мембран за рахунок фізичних процесів, пов'язаних із формуванням кристалів льоду, осмотичних градієнтів і механічних деформацій. Одночасно низькотемпературні умови мінімізують автоліз, протеоліз та інші деградаційні реакції, що є критично важливим при отриманні терапевтичних субстанцій для клінічного використання.

At the first stage, a search for literature sources was conducted using the following keywords: *cell lysis, cryogenic lysis, cold damage to membranes, freezing, cryoextract, tissue extracts, regulatory peptides, cell-free cryopreserved agents, mechanical lysis, chemical lysis, enzymatic lysis, lysis biotechnology, and regenerative medicine*.

In the second stage, we studied the abstracts of the articles and excluded publications that did not meet the study criteria or contained insufficient data on the mechanisms of lysis, cryogenic damage, or the characteristics of cryoextracts.

At the third stage, the full texts of the selected articles were analyzed for compliance with the specified inclusion criteria and evaluated for the relevance of methodological approaches, the detail of the description of lysis and cryodamage processes, as well as the informativeness regarding the composition and properties of bioactive molecules in cryoextracts.

The criteria for including publications in the sample subject to content analysis were:

1. coverage of current information on biotechnological methods of cell lysis, mechanisms of cold and cryogenic damage to membranes, and the biological properties of tissue cryoextracts and cell-free biological preparations;

2. compliance of studies with the key principles of evidence-based medicine, including clarity of methods, reproducibility of results, and quality of description of experimental procedures;

3. open access to the full-text article and sufficient information for systematic content analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Therapeutic tissue extracts (including cryoextracts), in particular, preparations based on the placenta, spleen, heart, liver, and other organs – constitute a separate area of modern biotechnology aimed at obtaining complexes of natural bioregulators with pronounced regenerative, immunomodulatory, cytoprotective, and reparative activity. Their clinical potential is determined by the biological value of native molecular structures: peptides, enzymes, hormone-like factors, low-molecular-weight metabolites, nucleotides, cell matrix fragments, and signaling molecules. Preserving these compounds in a biologically active state is a key criterion for the quality of a therapeutic drug [18, 19, 20].

The production of such biotechnological products is based on the principles of low-temperature disintegration, which allows for maximum preservation of the structural and functional activity of tissue components. Cryogenic treatment ensures the destruction of cell membranes through physical processes associated with the formation of ice crystals, osmotic gradients, and mechanical deformations. At the same time, lowtemperature conditions minimize autolysis, proteolysis, and other degradation reactions, which is critically important when obtaining therapeutic substances for clinical use.

The importance of a properly selected lysis strategy lies in the fact that different tissues – placenta, spleen,

Важливість правильно підібраної стратегії лізису полягає в тому, що різні тканини – плацента, селезінка, серце, печінка чи нервова тканина – відрізняються не лише щільністю і структурною організацією, але й унікальним набором біоактивних молекул, чутливих до температурних коливань, механічного впливу чи хімічних агентів. Наприклад, екстракти селезінки містять широкий спектр імунорегуляторних пептидів; препарати плаценти – гормоноподібні фактори й компоненти позаклітинного матриксу; тканини міокарда – цитозахисні низькомолекулярні сполуки та метаболічні фактори адаптації. Тому метод лізису повинен бути достатньо інтенсивним для повного вивільнення внутрішньотканинних компонентів, але водночас достатньо делікатним, щоб не порушувати їхню біологічну активність.

Отримання терапевтичних кріоекстрактів передбачає поєднання таких технологічних етапів, як контрольована кріоконсервація, стандартизоване руйнування клітинних структур, відділення твердих фракцій, очищення, стабілізація та забезпечення мікробіологічної безпеки. Саме технологія лізису визначає якісний склад кінцевого продукту, впливає на концентрацію регуляторних факторів, ступінь збереження білкових конформацій, фармакологічний профіль та клінічну ефективність [18, 19].

У цьому контексті системний аналіз різних методів лізису клітин – механічних, фізичних, хімічних, ферментативних та кріогенних – є необхідним етапом оптимізації біотехнологічних процесів виробництва тканинних терапевтичних екстрактів. Усвідомлення їх можливостей і обмежень дозволяє забезпечити відтвореність, стандартизацію й максимальне збереження біологічно активних молекул, що є критично важливим для створення високоякісних медико-біотехнологічних препаратів [20].

1. Сучасні підходи до лізису клітин: технологічні основи, механізми та практичне застосування

Вибір методу лізису визначається комплексом взаємопов'язаних характеристик, серед яких провідне значення мають тип клітини, структурна організація клітинної оболонки, фізико-хімічні властивості цільових макромолекул, а також технологічні вимоги до чистоти, стабільності й виходу кінцевого продукту [20, 21]. Установлено, що різні типи клітин демонструють неоднакову стійкість до механічного, хімічного чи ферментативного впливу, що зумовлює необхідність ретельної оптимізації умов лізису. Важливими також є параметри середовища, зокрема йонна сила, рН та наявність інгібіторів протеолізу, які істотно впливають на збереження просторової організації білків та нуклеїнових кислот. Подібний підхід забезпечує мінімізацію ризиків часткового руйнування або денатурації біомолекул, що є критично важливим у подальших етапах очищення та аналітичного визначення.

Механічні методи традиційно застосовують для мікроорганізмів зі щільною клітинною стінкою, оскільки вони забезпечують інтенсивний вплив сил зсуву, здатний розірвати міцні полімерні структури оболонок. Установлено, що ефективність механічного руйнування визначається низкою параметрів,

heart, liver or nervous tissue – differ not only in density and structural organization, but also in a unique set of bioactive molecules that are sensitive to temperature fluctuations, mechanical stress, or chemical agents. For example, spleen extracts contain a wide range of immunoregulatory peptides; placenta preparations contain hormone-like factors and extracellular matrix components; myocardial tissues contain cytoprotective low-molecular-weight compounds and metabolic adaptation factors. Therefore, the lysis method must be intense enough to completely release the intragranular components, but at the same time delicate enough not to disturb their biological activity.

The production of therapeutic cryoextracts involves a combination of technological stages such as controlled cryopreservation, standardized destruction of cell structures, separation of solid fractions, purification, stabilization, and ensuring microbiological safety. It is the lysis technology that determines the qualitative composition of the final product, affects the concentration of regulatory factors, the degree of preservation of protein conformations, the pharmacological profile, and clinical efficacy [18, 19].

In this context, a systematic analysis of various cell lysis methods – mechanical, physical, chemical, enzymatic, and cryogenic – is a necessary step in optimizing the biotechnological processes of producing tissue therapeutic extracts. Understanding their capabilities and limitations ensures reproducibility, standardization, and maximum preservation of biologically active molecules, which is critical for the creation of high-quality medical and biotechnological products [20].

1. Modern approaches to cell lysis: technological foundations, mechanisms, and practical application

The choice of lysis method is determined by a set of interrelated characteristics, among which the type of cell, the structural organization of the cell membrane, the physicochemical properties of the target macromolecules, as well as technological requirements for purity, stability, and yield of the final product [20, 21]. It has been established that different cell types demonstrate varying resistance to mechanical, chemical, or enzymatic effects, which necessitates careful optimization of lysis conditions. Environmental parameters are also important, including ionic strength, pH, and the presence of proteolysis inhibitors, which significantly affect the preservation of the spatial organization of proteins and nucleic acids. This approach minimizes the risk of partial destruction or denaturation of biomolecules, which is critically important in further stages of purification and analytical determination.

Mechanical methods are traditionally used for microorganisms with dense cell walls, as they provide intense shear forces capable of breaking down the strong polymer structures of the cell walls. It has been established that the effectiveness of mechanical destruction is determined by a number of parameters,

включно з розміром частинок, швидкістю зіткнень, в'язкістю суспензії та температурними умовами, які формуються під час фрагментації клітин. Бісерний млин демонструє високу результативність у руйнуванні грибів і бактерій, що підтверджено порівняльними дослідженнями ізоляції метаболітів у різних видів грибів [22]. У випадку рекомбінантних білків, зокрема під час роботи з *E. coli*, ефективність механічного руйнування продемонстровано в дослідженнях, де гомогенізація забезпечила високий вихід антигену гепатиту В [23]. Ці дані вказують на узгодженість механічних методів із сучасними біотехнологічними моделями отримання рекомбінантних протеїнів, де критичними є збереження епітопної структури та мінімізація фрагментації. Значну увагу привертають комбіновані підходи: поєднання хімічної обробки з механічним диспергуванням сприяє інтенсивнішому вивільненню білків, що набуває особливого значення при роботі з бактеріями, стійкими до однокомпонентного впливу [24]. Такі методи дозволяють зменшити енергетичні витрати та підвищити селективність руйнування оболонки, водночас зберігаючи внутрішньоклітинні компоненти.

Сучасні тенденції у виборі методів лізису спрямовані на зменшення енергоспоживання, збереження функціональної активності чутливих молекул і підвищення селективності процесу (табл. 1).

including particle size, collision velocity, suspension viscosity, and temperature conditions that are formed during cell fragmentation. A bead mill demonstrates high efficiency in the destruction of fungi and bacteria, as confirmed by comparative studies of metabolite isolation in different species of fungi [22]. In the case of recombinant proteins, particularly when working with *E. coli*, the effectiveness of mechanical destruction has been demonstrated in studies where homogenization provided a high yield of hepatitis B antigen [23]. These data indicate the compatibility of mechanical methods with modern biotechnological models for obtaining recombinant proteins, where preservation of the epitope structure and minimization of fragmentation are critical. Combined approaches are attracting considerable attention: the combination of chemical treatment with mechanical dispersion promotes more intensive protein release, which is particularly important when working with bacteria that are resistant to single-component exposure [24]. Such techniques reduce energy consumption and increase the selectivity of membrane destruction while preserving intracellular components.

Current trends in the selection of lysis methods are aimed at reducing energy consumption, preserving the functional activity of sensitive molecules, and increasing the selectivity of the process (Table 1).

Таблиця 1. Огляд та порівняння методів лізису клітин [20]
Table 1. Overview and comparison of cell lysis methods [20]

Методи лізису Lysis methods	Використане обладнання та техніка Equipment and technique used	Переваги Advantages	Недоліки Disadvantages
Механічний Mechanical	– гомогенізатор високого тиску – бісерні млини – high-pressure homogenizer – bead mills	– висока ефективність – не залежить від типу клітини – high efficiency – does not depend on cell type	– тепло, що утворюється, може пошкодити внутрішньоклітинні продукти – дорогий метод – важко очистити лізований зразок – heat generated may damage intracellular products – expensive method – difficult to purify the lysed sample
Фізичний Physical	Термічний лізис Thermal lysis	– незалежно від типу клітини – легко впровадити – independent of cell type – easy to implement	– дорого – пошкодження білків та внутрішньоклітинних компонентів – expensive – damage to proteins and intracellular components
	Кавітація Cavitation	– незалежно від типу клітини – можливість масштабної інтеграції – працює при нижчій температурі та рівні енергії – independent of cell type – possibility of large-scale integration – works at lower temperature and energy level	– дорогі технології – може пошкодити чутливі білки – важко очистити зразок від залишків / – expensive technologies – may damage sensitive proteins – difficult to purify the sample from residues
	Осмотичний шок Osmotic shock	– може використовуватися для екстракції чутливих внутрішньоклітинних продуктів – can be used for extraction of sensitive intracellular products	– не підходить для всіх типів клітин – not suitable for all cell types
Хімічний Chemical	Лужний лізис Alkaline lysis	– підходить для екстракції чутливих внутрішньоклітинних компонентів (білків, ферментів, ДНК) – підходить для всіх типів клітин – suitable for extraction of sensitive	– повільний процес (6–12 год) – slow process (6–12 h)

Продовження таблиці 1 / Continuation of Table 1

	Лужний лізис Alkaline lysis	intracellular components (proteins, enzymes, DNA) – suitable for all cell types	
	Лізис детергенту Detergent lysis	– підходить для вивільнення білка – suitable for protein release	– не підходить для виділення чутливих ферментів та білків – дорогі реагенти – видалення хімічного реагенту зі зразка після лізису є складним – нижча ефективність, оскільки повний лізис неможливий – not suitable for isolation of sensitive enzymes and proteins – expensive reagents – removal of the chemical reagent from the sample after lysis is difficult – lower efficiency since complete lysis is impossible
Біологічний Biological	Ферментативний лізис Enzymatic lysis	– може бути дуже специфічним для типів клітин – підходить для екстракції білків – may be very specific to cell types – suitable for protein extraction	– повний лізис неможливий – дорогі реагенти – повинен використовуватися в комбінації з мийними засобами для боротьби з бактеріями – complete lysis is impossible – expensive reagents – must be used in combination with detergents to combat bacteria

Одним із перспективних напрямів є оптимізація стратегій вивільнення продукту («*product release strategies*»), які справляють значний вплив на проектування біопроцесів і забезпечують контрольоване руйнування клітинних структур [25]. Фізичні технології, насамперед кавітаційні підходи, демонструють підвищену ефективність у випадку мікрободоростей і бактерій, що пов'язано зі здатністю кавітації формувати локальні градієнти тиску, достатні для руйнування міцних оболонок. Гідродинамічна кавітація показує суттєві переваги над акустичною під час деструкції мікроорганізмів, оскільки генерує інтенсивніші імпульсні навантаження [26]. У мікрободоростей із жорсткими клітинними стінками гідродинамічна кавітація визначена як одна з найбільш енергоефективних технологій у виробництві біопалива, що зумовлено оптимальним поєднанням механічного впливу і низького теплового навантаження [27]. Зменшення перегрівання під час кавітаційного руйнування дозволяє зберігати структуру термолабільних компонентів, що є критично важливим для стабільності ліпідів, пігментів та протеїнів.

Хімічні підходи зберігають важливе значення у випадках, коли необхідні м'які умови лізису або коли важливо забезпечити селективне руйнування певних компонентів клітини. Детергентні методи широко застосовують у протеоміці для інтактного фракціонування білків та попередження їх деградації під час очищення [20, 41]. Для грамнегативних бактерій ефективність лізису значною мірою залежить від складу буферних систем і концентрації реагентів, що стабілізують або порушують проникність зовнішньої мембрани. Установлено, що оптимізація складу реагентів для лізису *E. coli* забезпечує збільшення виходу нуклеїнових кислот і білків та придатна до застосування у мікрофлюїдних системах. У випадку жиророзчинних

One promising area is the optimization of product release strategies, which have a significant impact on bioprocess design and ensure controlled destruction of cell structures [25]. Physical technologies, primarily cavitation approaches, demonstrate increased efficiency in the case of microalgae and bacteria, which is associated with the ability of cavitation to form local pressure gradients sufficient to destroy strong membranes. Hydrodynamic cavitation shows significant advantages over acoustic cavitation in the destruction of microorganisms, as it generates more intense impulse loads [26]. In microalgae with rigid cell walls, hydrodynamic cavitation is identified as one of the most energy-efficient technologies in biofuel production, due to the optimal combination of mechanical impact and low thermal load [27]. Reducing overheating during cavitation destruction preserves the structure of thermolabile components, which is critical for the stability of lipids, pigments, and proteins.

Chemical approaches remain important in cases where mild lysis conditions are required or when it is important to ensure selective destruction of certain cell components. Detergent methods are widely used in proteomics for intact protein fractionation and prevention of their degradation during purification [20, 41]. For Gramnegative bacteria, the efficiency of lysis largely depends on the composition of buffer systems and the concentration of reagents that stabilize or disrupt the permeability of the outer membrane. It has been established that optimizing the composition of reagents for *E. coli* lysis increases the yield of nucleic acids and proteins and is suitable for use in microfluidic systems. In the case of lipid-containing microorganisms and algae, combining detergents with physical methods provides a significant increase in lipid yield compared to single technologies [28]. Such combinations compensate for the shortcomings of individual

мікроорганізмів та водоростей комбінування детергентів із фізичними методами забезпечує істотне підвищення виходу ліпідів порівняно з монотехнологіями [28]. Такі поєднання дозволяють компенсувати недоліки окремих методів і досягти кращого контролю над процесом руйнування клітин.

Ферментативний лізис зберігає провідне значення там, де потрібне селективне руйнування клітинних стінок без порушення конформації білкових комплексів. Механізми ферментативного гідролізу та чинники його оптимізації докладно описані в сучасних роботах, зокрема щодо вирішальної ролі pH і температури в досягненні повного розщеплення структури оболонки [29]. Ферментативний підхід особливо цінний у роботі з клітинами, що мають багаточарові або складні оболонки, оскільки дозволяє зберегти просторову організацію внутрішньоклітинних структур та уникнути небажаної денатурації чутливих молекул.

Активний розвиток мікрофлюїдних технологій суттєво прискорив створення методів лізису, які поєднують високу швидкість, точність, локальність і можливість інтеграції з аналітичними платформами. Бісерний лізис у мікроканалах забезпечує безперервність процесу та точний контроль інтенсивності механічного впливу, що є важливим у високопродуктивних системах аналізу [30]. Використання плазмово-нанотекстурованих поверхонь дозволяє ефективно захоплювати та руйнувати бактеріальні клітини, що забезпечує збільшення ефективності навіть у зразках з низькою концентрацією мікроорганізмів [31]. У мікрофлюїдних платформах також застосовують тепловий та хімічний лізис, включно з використанням автономних хімічних нагрівачів, придатних для портативних діагностичних систем [32]. Додаткові перспективи відкривають локальні методи вибіркового лізису окремих клітин, які дозволяють отримувати матеріал із мінімальним ушкодженням сусідніх клітин, що підвищує якість подальших молекулярних аналізів [33]. Окремі технологічні підходи спрямовані на контрольоване вивільнення окремих органел, зокрема ядер, що реалізовано у мікрофлюїдних системах із застосуванням оптично індукованого лізису [34].

Таким чином, сучасні методи лізису клітин демонструють істотний прогрес у напрямі підвищення селективності, керованості процесу, сумісності з мініатюризованими аналітичними платформами та збереження біомолекулярної цілісності. Комбінування механічних, фізичних, хімічних і ферментативних підходів дає змогу адаптувати стратегію лізису під специфічні завдання біотехнології, діагностики та аналітичної біохімії [20]. Така інтеграція дозволяє не лише підвищити вихід та чистоту отриманих продуктів, а й сформувати нові можливості для високоточних молекулярних досліджень у багатьох галузях біомедицини.

2. Каскад фізико-хімічних та біологічних процесів криогенного ушкодження клітинних мембран і його значення для вивільнення внутрішньоклітинних компонентів у складі криоекстрактів

Механізми крипошкодження мембран клітин у процесі заморожування тканин і подальшого отримання криоекстрактів формуються як результат

методів і досягти кращого контролю над процесом руйнування клітин.

Enzymatic lysis remains of paramount importance where selective destruction of cell walls is required without disturbing the conformation of protein complexes. The mechanisms of enzymatic hydrolysis and the factors for its optimization are described in detail in recent studies, in particular regarding the decisive role of pH and temperature in achieving complete cleavage of membrane structures [29]. The enzymatic approach is especially valuable when working with cells that have multilayered or complex membranes, as it allows the spatial organization of intracellular structures to be preserved and avoids unwanted denaturation of sensitive molecules.

The active development of microfluidic technologies has significantly accelerated the creation of lysis methods that combine high speed, accuracy, locality, and the ability to integrate with analytical platforms. Bead lysis in microchannels ensures process continuity and precise control of mechanical impact intensity, which is important in high-throughput analysis systems [30]. The use of plasma-nanotextured surfaces allows for the effective capture and destruction of bacterial cells, which increases efficiency even in samples with low concentrations of microorganisms [31]. Microfluidic platforms also use thermal and chemical lysis, including the use of autonomous chemical heaters suitable for portable diagnostic systems [32]. Additional prospects are opened up by local methods of selective lysis of individual cells, which allow material to be obtained with minimal damage to neighboring cells, thereby improving the quality of subsequent molecular analyses [33]. Some technological approaches are aimed at the controlled release of individual organelles, in particular nuclei, which is implemented in microfluidic systems using optically induced lysis [34].

Thus, modern methods of cell lysis demonstrate significant progress in terms of increasing selectivity, process controllability, compatibility with miniaturized analytical platforms, and preservation of biomolecular integrity. The combination of mechanical, physical, chemical, and enzymatic approaches allows the lysis strategy to be adapted to specific tasks in biotechnology, diagnostics, and analytical biochemistry [20]. Such integration not only increases the yield and purity of the products obtained, but also creates new opportunities for high-precision molecular research in many fields of biomedicine.

2. Cascade of physicochemical and biological processes cryogenic cell damage of membranes and its significance for the release of intracellular components in cryoextracts

The mechanisms of cryodamage to cell membranes during tissue freezing and subsequent cryoextract preparation are formed as a result of the complex

комплексної взаємодії фізичних, хімічних та біологічних чинників, що одночасно впливають на ліпідний бішар під дією низьких температур. Центральною концепцією, що пояснює характер цих змін, є гіпотеза мембранного пошкодження, запропонована *Quinn P.J. (1985 p.)*, відповідно до якої руйнування мембран клітин зумовлене термотропними фазовими переходами ліпідів і пов'язаними з ними перебудовами структурних елементів бішару [35]. Зниження температури ініціює послідовність фазових переходів, що супроводжуються виникненням механічних та хімічних дефектів, які порушують бар'єрні й регуляторні функції мембрани. Оскільки мембранний комплекс відіграє ключову роль у збереженні внутрішньоклітинного гомеостазу, навіть мінімальні зміни структури й динаміки здатні ініціювати глибокі клітинні дисфункції [36].

У нормальних фізіологічних умовах ліпідні мембрани перебувають у фазово-рідкому стані, що забезпечує текучість, оптимальний рівень упорядкування та гнучкість бішару. Такий стан визначає латеральну мобільність білків, формування мікродоменів, функціонування каналів, ферментних комплексів і сигнальних шляхів. Навіть локальні порушення цієї динамічної рівноваги можуть спричинити зниження цілісності мембрани, блокування транспорту іонів і метаболітів та порушення клітинної регуляції [37].

Під час охолодження фазово-рідкий стан переходить у гелеподібний, але цей процес є просторово неоднорідним через гетерогенний склад мембрани. Різні компоненти бішару тверднуть при різних температурах, унаслідок чого формуються домени рідкої й твердої фази та мозаїчна структура мембрани. На межах цих доменів виникають мікродефекти – ділянки підвищеного натягу й локальні порушення упаковки ліпідних ланцюгів. Ці дефекти легко збільшуються при подальшому охолодженні чи механічному впливі, що робить їх основними точками дестабілізації мембрани [38].

Фазове розділення впливає також на мембранні білки, чутливі до фізико-хімічного стану ліпідного матриксу. Порушення білок-ліпідних взаємодій зумовлює конформаційні зміни білків, їх латеральну сегрегацію або агрегацію, а також дестабілізацію функціональних доменів. Це порушує активність транспортерів, ферментів, рецепторів та інших білкових комплексів, що в кінцевому підсумку призводить до декомпенсації регуляторних механізмів і втрати контролю за трансмембранними потоками [39].

Структурні дефекти мембрани викликають підвищення її проникності, що супроводжується втратою іонів, біокатіонів і низькомолекулярних метаболітів. Такі втрати є ознакою незворотного порушення бар'єрних властивостей бішару та часто завершуються загибеллю клітини після розморожування. Водночас вихід внутрішньоклітинних компонентів визначає біоактивний профіль кріоекстрактів, оскільки саме вони формують їхній молекулярний склад і біологічну активність [40].

Важливим чинником кріопшкодження є механічні зміни мембрани, пов'язані з порушенням водного балансу клітини при заморожуванні. Пошкодження клітинних структур у процесі циклічного заморожування-відтавання формують комплекс взаємопов'язаних

interaction of physical, chemical, and biological factors that simultaneously affect the lipid bilayer under the influence of low temperatures. The central concept explaining the nature of these changes is the membrane damage hypothesis proposed by *Quinn P.J. (1985)*, according to which the destruction of cell membranes is caused by thermotropic phase transitions of lipids and the associated rearrangements of the structural elements of the bilayer [35]. A decrease in temperature initiates a sequence of phase transitions accompanied by the emergence of mechanical and chemical defects that disrupt the barrier and regulatory functions of the membrane. Since the membrane complex plays a key role in maintaining intracellular homeostasis, even minimal changes in structure and dynamics can initiate profound cellular dysfunction [36].

Under normal physiological conditions, lipid membranes are in a phase-liquid state, which ensures fluidity, optimal order, and flexibility of the bilayer. This state determines the lateral mobility of proteins, the formation of microdomains, and the functioning of channels, enzyme complexes, and signaling pathways. Even local disturbances of this dynamic equilibrium can cause a decrease in membrane integrity, blockage of ion and metabolite transport, and disruption of cellular regulation [37].

During cooling, the phase-liquid state transitions to a gel-like state, but this process is spatially heterogeneous due to the heterogeneous composition of the membrane. Different components of the bilayer solidify at different temperatures, resulting in the formation of liquid and solid phase domains and a mosaic membrane structure. Microdefects arise at the boundaries of these domains – areas of increased tension and local disturbances in the packing of lipid chains. These defects easily increase with further cooling or mechanical stress, making them the main points of membrane destabilization [38].

Phase separation also affects membrane proteins that are sensitive to the physicochemical state of the lipid matrix. Disruption of protein-lipid interactions causes conformational changes in proteins, their lateral segregation or aggregation, and destabilization of functional domains. This disrupts the activity of transporters, enzymes, receptors, and other protein complexes, ultimately leading to decompensation of regulatory mechanisms and loss of control over transmembrane flows [39].

Structural defects in the membrane cause an increase in its permeability, accompanied by the loss of ions, biocations, and low-molecular-weight metabolites. Such losses are a sign of irreversible disruption of the barrier properties of the bilayer and often result in cell death after thawing. At the same time, the release of intracellular components determines the bioactive profile of cryoextracts, since they form their molecular composition and biological activity [40].

An important factor in cryodamage is mechanical changes in the membrane associated with a disruption of the cell's water balance during freezing. Damage to cell structures during cyclic freezing and thawing forms a complex of interrelated phenomena, the main ones being extracellular and intracellular ice formation. Figure 1 schematically shows three successive

явищ, головними серед яких є позаклітинне та внутрішньоклітинне льодоутворення. На рис. 1. схематично показано три послідовні стадії кріпошкодження: інтактна клітина (1), ушкодження мембрани кристалами льоду та фазовими перебудовами (2), повна деструкція мембрани з вивільненням цитоплазматичних компонентів (3).

stages of cryodamage: intact cell (1), damage to the membrane by ice crystals and phase rearrangements (2), complete destruction of the membrane with the release of cytoplasmic components (3).

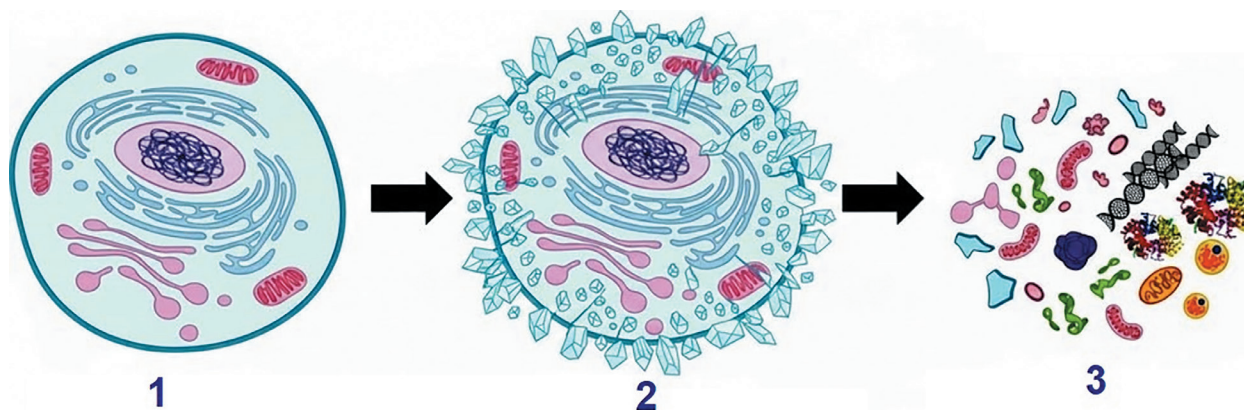


Рис. 1. Стадії кріпошкодження клітини та формування кріоекстракту (модифіковано за [20])
Fig. 1. Stages of cryodamage to cells and formation of cryoextract (modified from [20])

Примітки / Notes:

- 1 – інтактна клітина з упорядкованою ультраструктурою та збереженою цілісністю мембран;
 - 2 – клітина в умовах заморозування з утворенням позаклітинних і внутрішньоклітинних кристалів льоду, механічними та фазовими змінами мембран;
 - 3 – руйнування мембрани та вихід внутрішньоклітинних компонентів, що формує молекулярний склад кріоекстракту.
- 1 – intact cell with ordered ultrastructure and preserved membrane integrity;
 - 2 – cell under freezing conditions with the formation of extracellular and intracellular ice crystals, mechanical and phase changes in membranes;
 - 3 – destruction of the membrane and release of intracellular components, forming the molecular composition of the cryoextract.

Як відомо, внутрішньоклітинна вода переходить у позаклітинний простір завдяки вищому хімічному потенціалу порівняно з льодовою фазою зовні клітини. Це спричиняє інтенсивне зневоднення цитоплазми, зміну осмотичного балансу та формування умов, за яких клітина зазнає значних деформацій під впливом позаклітинного льоду та різко зростаючого осмотичного тиску. Проте прискорення швидкості охолодження створює протилежну ситуацію: вода не встигає залишити клітину, формується внутрішньоклітинний лід, що порушує ультраструктуру і часто призводить до фатальних ушкоджень. Таким чином, незалежно від темпу охолодження, утворення кристалів льоду залишається неминучим процесом.

Вітрифікація дає змогу уникнути льодноіндукованого пошкодження завдяки переходу розчину у склоподібний стан без кристалізації, що забезпечується надвисокою концентрацією кріопротекторів. Попри це, критично важливими залишаються явища девітрифікації та рекристалізації під час нагрівання, які здатні спричинити значні структурні пошкодження клітинних компонентів. Додатковим обмеженням є токсичність високих доз кріопротекторів, що звужує межі їх практичного застосування. Отже, зародження кристалів, ріст льодових структур та процеси рекристалізації/девітрифікації становлять три ключові групи факторів ушкодження [41].

Позаклітинний лід не лише чинить механічний тиск на клітинні структури, але й зумовлює різке збільшення концентрації розчинених речовин та розвиток

As is known, intracellular water passes into the extracellular space due to its higher chemical potential compared to the ice phase outside the cell. This causes intense dehydration of the cytoplasm, a change in osmotic balance, and the formation of conditions under which the cell undergoes significant deformation under the influence of extracellular ice and rapidly increasing osmotic pressure. However, accelerating the cooling rate creates the opposite situation: water does not have time to leave the cell, intracellular ice forms, which disrupts the ultrastructure and often leads to fatal damage.

Thus, regardless of the cooling rate, the formation of ice crystals remains an inevitable process.

Vitrification allows ice-induced damage to be avoided by transitioning the solution into a glassy state without crystallization, which is achieved by an ultra-high concentration of cryoprotectants. Despite this, devitrification and recrystallization during heating remain critical phenomena that can cause significant structural damage to cellular components. An additional limitation is the toxicity of high doses of cryoprotectants, which narrows the scope of their practical application. Thus, crystal nucleation, ice structure growth, and recrystallization/devitrification processes constitute three key groups of damage factors [41].

Extracellular ice not only exerts mechanical pressure on cellular structures, but also causes a sharp increase in the concentration of dissolved substances and the development of osmotic stress [42]. Cryo-electron microscopy has demonstrated the characteristic

осмотичного стресу [42]. Кріоелектронна мікроскопія продемонструвала характерне формування дрібних гексагональних кристалів льоду у периферичних ділянках зразків [43]. Стан клітин у таких умовах значною мірою визначається фізико-хімічними властивостями позаклітинного розчину, що формується під впливом льодоутворення. Доведено, що надмірне зменшення частки незамерзлої води в умовах повільного заморожування зумовлює критичне підвищення концентрації солей і може спричинити необоротні ушкодження [43, 44].

Позаклітинний лід також відіграє ключову роль у періоді танення, особливо в температурному діапазоні від -15 до -160 °C, який вважають зоною підвищеного ризику рекристалізації [45]. У цей проміжок дрібні кристали та частково рідка вода здатні перетворюватися на більшій структурі, що значно підвищує ризик ушкодження. Таким чином, контроль кінетики зародження і росту льоду під час нагрівання є одним із найперспективніших напрямків сучасних досліджень, оскільки перекристалізація льоду є багатфакторним процесом, чутливим до швидкості нагрівання, градієнтів температури та стану позаклітинного середовища.

Внутрішньоклітинне льодоутворення розвивається переважно за умов швидкого охолодження, коли цитоплазматична вода не встигає залишити клітину. Розуміння механізмів цього процесу стало важливим елементом сучасної кріобіології, оскільки саме внутрішньоклітинний лід є головним предиктором летального ушкодження клітин і тканин. Значна кількість експериментальних робіт присвячена розробці моделей, що пояснюють закономірності внутрішньоклітинної кристалізації [46]. Основними теоретичними концепціями, що описують ініціацію внутрішньоклітинного льоду, є теорія пор, модель поверхнево-каталізованого та об'ємно-каталізованого зародження, а також гіпотеза мембранного пошкодження [46]. Сукупні дані свідчать, що процес залежить від швидкості охолодження, проникності мембран для води, ступеня внутрішньоклітинного переохолодження, стану мембранних структур і впливу позаклітинного льоду.

Класична модель, що передбачає формування прогностичних рівнянь для внутрішньоклітинного льоду, показала домінуючу роль швидкості охолодження та параметрів водонепроникності в оцінці імовірності льодоутворення, що дає змогу визначити межі температурної та часової безпеки клітин [47]. Під час нагрівання динаміка внутрішньоклітинних льодових фаз також зазнає значних змін: за даними, кількість кристалів зменшується, але їхній розмір збільшується, що відображає процес рекристалізації [41, 48]. Доведено, що повільне нагрівання сприяє більш вираженій рекристалізації, тоді як швидкі режими нагрівання обмежують укрупнення кристалів та зменшують пошкодження. Таким чином, внутрішньоклітинний лід є одним із найкритичніших факторів ризику при циклах заморожування-відтавання, а вивчення його механізмів і шляхів запобігання ушкодженню органел залишається ключовим науковим пріоритетом у галузі кріобіології.

formation of small hexagonal ice crystals in the peripheral areas of samples [43]. The state of cells in such conditions is largely determined by the physicochemical properties of the extracellular solution formed under the influence of ice formation. It has been proven that an excessive decrease in the proportion of unfrozen water under conditions of slow freezing causes a critical increase in salt concentration and can cause irreversible damage [43, 44].

Extracellular ice also plays a key role in the melting period, especially in the temperature range from -15 to -160 °C, which is considered a zone of increased risk of recrystallization [45]. During this period, small crystals and partially liquid water can transform into larger structures, which significantly increases the risk of damage. Thus, controlling the kinetics of ice nucleation and growth during heating is one of the most promising areas of current research, since ice recrystallization is a multifactorial process that is sensitive to the heating rate, temperature gradients, and the state of the extracellular environment.

Intracellular ice formation develops mainly under conditions of rapid cooling, when cytoplasmic water does not have time to leave the cell. Understanding the mechanisms of this process has become an important element of modern cryobiology, since intracellular ice is the main predictor of lethal damage to cells and tissues. A significant number of experimental studies are devoted to the development of models that explain the patterns of intracellular crystallization [46]. The main theoretical concepts describing the initiation of intracellular ice are the pore theory, the surfacecatalyzed and volume-catalyzed nucleation model, and the membrane damage hypothesis [46]. The cumulative data indicate that the process depends on the cooling rate, membrane permeability to water, the degree of intracellular supercooling, the state of membrane structures, and the influence of extracellular ice.

The classical model, which involves the formation of predictive equations for intracellular ice, has shown the dominant role of cooling rate and water permeability parameters in assessing the probability of ice formation, which makes it possible to determine the limits of temperature and time safety for cells [47]. During heating, the dynamics of intracellular ice phases also undergo significant changes: according to the data, the number of crystals decreases, but their size increases, reflecting the recrystallization process [41, 48]. It has been proven that slow heating promotes more pronounced recrystallization, while rapid heating modes limit crystal enlargement and reduce damage. Thus, intracellular ice is one of the most critical risk factors in freezethaw cycles, and studying its mechanisms and ways to prevent organelle damage remains a key scientific priority in cryobiology.

3. Секретом і клітинні екстракти як безклітинні платформи регенеративної медицини: механізми дії, переваги та перспективи клінічного застосування

Аналіз фізико-хімічних і біологічних механізмів криогенного ушкодження мембран свідчить, що процеси заморожування-відтавання забезпечують контрольоване вивільнення внутрішньоклітинних компонентів, формуючи багатокомпонентні криоекстракти з високою функціональною активністю. Отримані результати підтверджують, що криогенна деструкція тканин створює середовище, насичене ендogenous пептидами, білками, ферментами, низькомолекулярними метаболітами та структурними фрагментами клітинного матриксу, які здатні ініціювати репаративні, імунотулювальні та цитопротекторні ефекти.

Разом із цим розуміння природи цих біоактивних субстанцій логічно підводить до ширшої концепції міжклітинної комунікації, у межах якої ключову роль відіграє секретом – еволюційно сформована система позаклітинних сигналів, що не потребує руйнування клітин для реалізації своїх ефектів. На відміну від криоекстрактів, які формуються внаслідок структурної деструкції тканин, секретом є продукт фізіологічної секреції, що забезпечує тонку регуляцію міжклітинної взаємодії шляхом впорядкованого вивільнення біологічно активних молекул у позаклітинне середовище.

Перехід від тканинних криоекстрактів до аналізу секретому є законним, оскільки обидва підходи базуються на використанні природних біорегуляторів, проте відрізняються принципами формування, ступенем контрольованості компонентного складу та механізмами дії. Саме зіставлення цих двох платформ – криогенних екстрактів та секретом-опосередкованих факторів – дозволяє глибше оцінити потенціал безклітинних технологій у регенеративній медицині та переходити до всебічного розгляду секретому як автономної терапевтичної системи.

На сьогодні під терміном «секретом» розуміють сукупність молекулярних компонентів, які вивільняються у позаклітинний простір і є функціонально активними в контексті міжклітинних взаємодій. До його складу входять розчинні білкові фактори, пептиди, вільні нуклеїнові кислоти, ліпідні медіатори, а також позаклітинні везикули різних розмірних класів. Останні традиційно поділяють на апоптотичні тільця, мікрочастинки та екзосоми [49, 50, 51, 52, 53]. Формування такого комплексу є динамічним процесом, чутливим до фізіологічних коливань, стресових стимулів або патологічних станів, що надає секретому властивостей маркера мікрооточення та потенційного модифікатора клітинних відповідей. Встановлено, що секретом окремих клітин і тканин характеризується високою специфічністю структурного складу, а його біологічна активність здатна відтворювати широкий спектр регуляторних ефектів, які раніше приписували лише інтактним клітинам.

Терапевтичний потенціал стовбурових клітин зазвичай пов'язують із трьома провідними механізмами дії, кожен з яких формує окремий рівень біологічного впливу та визначає клінічну ефективність клітинних технологій. Перший механізм пов'язаний із процесом «хомінгу», тобто спрямованої міграції

3. The secret and extracts extracts as cell-free platforms regenerative medicine: mechanisms of action, advantages and prospects for clinical application

Analysis of the physicochemical and biological mechanisms of cryogenic membrane damage shows that freezing-thawing processes ensure controlled release of intracellular components, forming multicomponent cryoextracts with high functional activity. The results confirm that cryogenic tissue destruction creates an environment saturated with endogenous peptides, proteins, enzymes, low molecular weight metabolites, and structural fragments of the cellular matrix that are capable of initiating reparative, immunomodulatory, and cytoprotective effects.

At the same time, understanding the nature of these bioactive substances logically leads to a broader concept of intercellular communication, in which secretion plays a key role—an evolutionarily formed system of extracellular signals that does not require cell destruction to exert its effects. Unlike cryoextracts, which are formed as a result of structural tissue destruction, secretions are products of physiological secretion that ensure fine regulation of intercellular interaction through the orderly release of biologically active molecules into the extracellular environment.

The transition from tissue cryoextracts to secretion analysis is logical, since both approaches are based on the use of natural bioregulators, but differ in the principles of formation, the degree of controllability of the component composition, and the mechanisms of action. It is the comparison of these two platforms – cryogenic extracts and secretion-mediated factors – that allows for a deeper assessment of the potential of cell-free technologies in regenerative medicine and a transition to a comprehensive consideration of secretions as an autonomous therapeutic system.

Today, the term «secret» refers to a set of molecular components that are released into the extracellular space and are functionally active in the context of intercellular interactions. It includes soluble protein factors, peptides, free nucleic acids, lipid mediators, as well as extracellular vesicles of various size classes. The latter are traditionally divided into apoptotic bodies, microparticles, and exosomes [49, 50, 51, 52, 53]. The formation of such a complex is a dynamic process, sensitive to physiological fluctuations, stress stimuli, or pathological conditions, which gives the secretome the properties of a microenvironment marker and a potential modifier of cellular responses. It has been established that the secretion of individual cells and tissues is characterized by a high specificity of structural composition, and its biological activity is capable of reproducing a wide range of regulatory effects that were previously attributed only to intact cells.

The therapeutic potential of stem cells is usually associated with three leading mechanisms of action, each of which forms a separate level of biological influence and determines the clinical effectiveness of cell technologies. The first mechanism is associated with the process of «homing,» i.e., the directed migration of systemically administered stem cells to the site of acute damage. It has been established that this process is realized due

системно введених стовбурових клітин до вогнища гострого пошкодження. Встановлено, що цей процес реалізується за рахунок градієнтів хемоатрактивних сигнальних молекул, які утворюються у зоні ушкодження внаслідок вивільнення факторів запалення, цитокінів та хемокінів. Наявні дані свідчать про те, що схожість цього процесу з міграцією лейкоцитів не є випадковою, оскільки обидва типи клітин використовують спільні принципи хемоатракції та адгезії до ендотелію. Передбачається, що хемотаксис стовбурових клітин опосередковується взаємодією з низкою рецепторів клітинної поверхні, зокрема хемокіновими рецепторами, які визначають напрямок руху клітин у бік зон максимального градієнта. Хоча детальний алгоритм взаємодії стовбурових клітин з ендотелієм у тканині-мішені залишається недостатньо з'ясованим, є підстави вважати, що ключову роль у цьому процесі відіграють інтегрини та селектини, які забезпечують тимчасову фіксацію і поступове «прикочування» клітин уздовж ендотеліальної поверхні [49, 54, 55].

Після ініціальної адгезії відбувається наступний важливий етап – трансміграція стовбурових клітин через ендотеліальний бар'єр до зони пошкодження. Встановлено, що ця стадія також реалізується за лейкоцитоподібним сценарієм і включає взаємодію з молекулою адгезії судинних клітин 1 (VCAM-1), яка забезпечує стабілізацію клітини на поверхні ендотелію та ініціює подальшу трансендотеліальну міграцію. Додатково цей процес залежить від активації рецепторів, пов'язаних з G-білком, що беруть участь у внутрішньоклітинній сигналізації та узгодженні цитоскелетної перебудови з напрямком руху клітини [56]. З огляду на це, хомінг розглядається не лише як фізіологічний механізм переміщення клітин, але й як критичний етап, що забезпечує адресність та ефективну реалізацію відновного потенціалу стовбурових клітин у конкретному мікрооточенні.

Другий механізм дії стовбурових клітин пов'язаний із їх здатністю до диференціації у кілька типів клітин, що притаманні тканині-мішені. Встановлено, що стовбурові клітини можуть інтегруватися у локальну структуру пошкодженої тканини, замінювати або доповнювати популяцію резидентних клітин і тим самим сприяти відновленню її функціональної цілісності [57]. Такий механізм особливо важливий у ситуаціях, коли ушкодження супроводжується втратою значної кількості клітин, а локальні ресурси ендогенних клітин-передників виявляються недостатніми для адекватного відновлення. Проте роль цього механізму може варіювати залежно від типу тканини, фази регенераційного процесу та індивідуальних особливостей організму, що потребує критичного переосмислення при оцінці загального внеску диференціації у регенеративний ефект.

Третій ключовий механізм пов'язаний із секрецією стовбуровими клітинами широкого спектра біоактивних молекул, включно з цитокінами, факторами росту, імуномодуляторами та іншими сигнальними медіаторами. Ці біорегуляторні фактори здатні впливати як на локальні процеси у зоні пошкодження, так і на системні фізіологічні реакції, модулюючи запалення, апоптоз, ангіогенез та ремоделювання тканин [58]. Сучасна концепція «паракринної дії» розглядає цей механізм

to gradients of chemoattractive signaling molecules that are formed in the area of damage as a result of the release of inflammatory factors, cytokines, and chemokines. Available data indicate that the similarity of this process to leukocyte migration is not accidental, since both cell types use common principles of chemoattraction and adhesion to the endothelium. It is assumed that stem cell chemotaxis is mediated by interaction with a number of cell surface receptors, in particular chemokine receptors, which determine the direction of cell movement towards areas of maximum gradient. Although the detailed algorithm of stem cell interaction with the endothelium in the target tissue remains unclear, there is reason to believe that integrins and selectins play a key role in this process, providing temporary fixation and gradual «rolling» of cells along the endothelial surface [49, 54, 55].

After initial adhesion, the next important stage occurs—the transmigration of stem cells through the endothelial barrier to the damage site. It has been established that this stage also follows a leukocyte-like scenario and involves interaction with vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), which stabilizes the cell on the endothelial surface and initiates further transendothelial migration. Additionally, this process depends on the activation of G protein-coupled receptors involved in intracellular signaling and coordination of cytoskeletal reorganization with the direction of cell movement [56]. In view of this, homing is considered not only as a physiological mechanism of cell movement, but also as a critical stage that ensures the targeting and effective realization of the regenerative potential of stem cells in a specific microenvironment.

The second mechanism of action of stem cells is related to their ability to differentiate into several types of cells that are characteristic of the target tissue. It has been established that stem cells can integrate into the local structure of damaged tissue, replace or supplement the population of resident cells, and thus contribute to the restoration of its functional integrity [57]. This mechanism is especially important in situations where damage is accompanied by the loss of a significant number of cells, and local resources of endogenous progenitor cells are insufficient for adequate recovery.

However, the role of this mechanism may vary depending on the type of tissue, the phase of the regenerative process, and the individual characteristics of the organism, which requires critical rethinking when assessing the overall contribution of differentiation to the regenerative effect.

The third key mechanism is associated with the secretion of a wide range of bioactive molecules by stem cells, including cytokines, growth factors, immunomodulators, and other signaling mediators. These bioregulatory factors can influence both local processes in the area of damage and systemic physiological responses, modulating inflammation, apoptosis, angiogenesis and tissue remodeling [58]. The modern concept of «paracrine action» considers this mechanism to be dominant in most clinical situations, as it provides a rapid and multi-vector effect on cellular networks without the need for prolonged integration of the stem cells themselves into the tissue.

як домінуючий у більшості клінічних ситуацій, оскільки він забезпечує швидкий і мультивекторний вплив на клітинні мережі без необхідності тривалої інтеграції самих стовбурових клітин у тканину.

Таким чином, сукупність цих трьох механізмів – хомінгу, диференціації та паракринної активності – формує комплексний терапевтичний ефект, який лежить в основі сучасних підходів до регенеративної медицини та клітинної терапії.

У регенеративній медицині застосування безклітинних терапевтичних продуктів, зокрема кріоекстрактів з різних біологічних тканин (плацента, селезінка, серцева тканина, шкіра та ін.) або секретому, отриманого з мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), відкриває низку принципових переваг порівняно зі стратегіями, що базуються на трансплантації життєздатних клітинних популяцій (табл. 2).

Thus, the combination of these three mechanisms – homing, differentiation, and paracrine activity – forms a complex therapeutic effect that underlies modern approaches to regenerative medicine and cell therapy.

In regenerative medicine, the use of cell-free therapeutic products, in particular cryo-extracts from various biological tissues (placenta, spleen, heart tissue, skin, etc.) or secretions obtained from mesenchymal stem cells (MSCs) offers a number of fundamental advantages over strategies based on the transplantation of viable cell populations (Table 2).

Таблиця 2. Порівняльна характеристика терапії екзосомами МСК та клітинної трансплантації МСК: переваги й обмеження [59]
Table 2. Comparative characteristics of MSC exosome therapy and MSC cell transplantation: advantages and limitations [59]

Використання екзосом з МСК Use of MSC exosomes	Трансплантація МСК MSC transplantation
Переваги Advantages	
(1) Низька імуногенність (2) Відсутність реплікаційної здатності (3) Виразений вплив на печінку (4) Накопичення кількох біоактивних факторів (5) Простота виробництва (1) Low immunogenicity (2) Absence of replicative capacity (3) Pronounced effect on the liver (4) Accumulation of several bioactive factors (5) Ease of production	(1) Висока здатність до регенерації та диференціації (2) Сильна адаптивна здатність (3) Доведена ефективність у клінічних застосуваннях (1) High capacity for regeneration and differentiation (2) Strong adaptive capacity (3) Proven effectiveness in clinical applications
Недоліки Disadvantages	
(1) Висока гетерогенність через недостатню стандартизацію методів екстракції та очищення (2) Короткотривала біологічна активність і складнощі зі зберіганням (3) Можливість контамінації (1) High heterogeneity due to insufficient standardization of extraction and purification methods (2) Short-term biological activity and storage difficulties (3) Possibility of contamination	(1) Нестабільний фенотип (2) Невизначене виживання та поширення після трансплантації (3) Потенційна онкогенність (4) Ризик клітинного відторгнення при алогенній трансплантації (5) Складні виробничі процеси (6) Ризик патологічної прогресії через аберантну диференціацію (7) Можливість судинної оклюзії та тромбозу (1) Unstable phenotype (2) Uncertain survival and distribution after transplantation (3) Potential oncogenicity (4) Risk of cellular rejection in allogeneic transplantation (5) Complex manufacturing processes (6) Risk of pathological progression due to aberrant differentiation (7) Possibility of vascular occlusion and thrombosis

По-перше, використання секретому мінімізує низку ризиків безпеки, притаманних введенню проліферативних клітин, включно з проблемами імунної сумісності, потенційною онкогенністю, формуванням мікроемболів та можливістю передачі інфекційних агентів [60, 61, 62]. По-друге, секретом МСК піддається стандартизованій оцінці щодо безпечності, дозових характеристик та терапевтичної ефективності, що наближає його до класичної фармакологічної моделі й спрощує регуляторні підходи. По-третє, зберігання секретому не потребує використання кріоконсервантів, що потенційно знижує токсикологічні

First, the use of secretions minimizes a number of safety risks associated with the introduction of proliferative cells, including immune compatibility issues, potential oncogenicity, microembolism formation, and the possibility of transmitting infectious agents [60, 61, 62]. Second, MSC secretions undergo standardized evaluation for safety, dosage characteristics, and therapeutic efficacy, which brings them closer to the classical pharmacological model and simplifies regulatory approaches. Third, storage of the secretions does not require the use of cryopreservatives, which potentially reduces toxicological risks and allows the

ризика та дозволяє зберігати стабільність продукту тривалий час без втрати активності [60, 61, 62]. По-четверте, застосування секретому, такого як кондиціоноване середовище (КС), є більш практичним і економічно вигідним з огляду на відсутність необхідності у травматичних процедурах забору клітин, що забезпечує кращу доступність для клінічної практики [63]. По-п'яте, масштабування виробництва можливе завдяки використанню стандартизованих клітинних ліній у контрольованих умовах, що дає змогу отримувати репродуктивні партії біоактивних молекул без варіабельності, притаманної первинним клітинним культурам. По-шосте, час та вартість розширення МСК у культурі можуть бути суттєво знижені, що створює можливість негайного застосування секретомних препаратів при гострих станах – ішемії головного мозку, інфаркті міокарда або політравмі. Нарешті, отримані біологічні продукти за потреби можуть бути модифіковані *in vitro* з метою посилення специфічних ефектів, оптимізації спрямованості дії або регуляції тривалості біологічної активності [49].

КС являє собою повний комплекс ефекторних компонентів секретому клітинного походження, який включає як розчинні молекули, так і везикулярні структури. Виділення розчинної частини секретому від фракції мікровезикул може бути здійснене за допомогою диференційного центрифугування, мембранної фільтрації, полімерного осадження, іонообмінної хроматографії або хроматографії з виключенням за розміром [64]. Кожен із цих методів має власні обмеження щодо селективності, виходу та чистоти продукту, що формує потенційні джерела варіабельності й вимагає стандартизації умов для отримання відтворюваних терапевтичних препаратів. Накопичені експериментальні дані демонструють, що як розчинні фактори секретому, так і везикулярні елементи здатні самостійно ініціювати тканинну регенерацію, опосередковувати репаративні реакції та навіть активувати процеси *de novo* органогенезу при моделюванні тканинно-інженерних конструктів *ex vivo* [49, 65, 66]. Така подвійність дії свідчить про комплексний характер секретому як інтегрованої платформи міжклітинної сигналізації, потенційно здатної відтворювати ефекти МСК без використання самих клітин.

У низці досліджень встановлено, що КС, отримане з МСК, забезпечує істотне покращення широкого спектра біомаркерів патологічних процесів та у багатьох експериментальних моделях демонструє ефективність, зіставлювану з трансплантацією самих МСК (табл. 1). Такий ефект підтверджує ключову роль секретом-опосередкованих механізмів у терапевтичній дії МСК та формує основу для подальшого розвитку безклітинних біопрепаратів у регенеративній медицині.

Сучасний аналіз молекулярних і біологічних властивостей клітинних екстрактів свідчить про те, що ця група безклітинних продуктів посідає окреме місце серед регенеративних підходів, оскільки поєднує високу біологічну активність із низьким профілем ризиків, притаманних застосуванню життєздатних клітин. Клітинний екстракт визначають як гетерогенну суміш внутрішньоклітинних компонентів, що формується під час контрольованого руйнування клітинної мембрани та містить широкий спектр розчинних

product to remain stable for a long time without losing its activity [60, 61, 62]. Fourth, the use of secretions, such as conditioned medium (CM), is more practical and cost-effective given the absence of traumatic cell collection procedures, which ensures better accessibility for clinical practice [63]. Fifth, scaling up production is possible thanks to the use of standardized cell lines under controlled conditions, which makes it possible to obtain reproducible batches of bioactive molecules without the variability inherent in primary cell cultures. Sixth, the time and cost of expanding MSCs in culture can be significantly reduced, which creates the possibility of immediate use of secretory preparations in acute conditions – cerebral ischemia, myocardial infarction, or multiple trauma. Finally, the biological products obtained can be modified *in vitro* as needed to enhance specific effects, optimize the direction of action, or regulate the duration of biological activity [49].

CS is a complete complex of effector components of cell-derived secretions, which includes both soluble molecules and vesicular structures. The soluble part of thesecretion can be separated from the microvesicle fraction by differential centrifugation, membrane filtration, polymer precipitation, ion exchange chromatography, or size exclusion chromatography [64]. Each of these methods has its own limitations in terms of selectivity, yield, and product purity, which creates potential sources of variability and requires standardization of conditions for obtaining reproducible therapeutic drugs. Accumulated experimental data demonstrate that both soluble factors of the secretome and vesicular elements are capable of independently initiating tissue regeneration, mediating reparative responses, and even activating *de novo* organogenesis processes in *ex vivo* tissue engineering constructs [49, 65, 66]. This dual action indicates the complex nature of the secretome as an integrated platform for intercellular signaling, potentially capable of reproducing the effects of MSCs without the use of the cells themselves.

A number of studies have found that CS obtained from MSCs provides a significant improvement in a wide range of biomarkers of pathological processes and, in many experimental models, demonstrates efficacy comparable to the transplantation of MSCs themselves (Table 1). This effect confirms the key role of secretion-mediated mechanisms in the therapeutic action of MSCs and forms the basis for the further development of cell-free biological products in regenerative medicine.

Modern analysis of the molecular and biological properties of cell extracts indicates that this group of cell-free products occupies a special place among regenerative approaches, as it combines high biological activity with a low risk profile inherent in the use of viable cells. Cell extract is defined as a heterogeneous mixture of intracellular components formed during the controlled destruction of the cell membrane and containing a wide range of soluble and structural molecules—proteins, nucleic acids, lipids, carbohydrates, low molecular weight metabolites, and organelle fragments [67, 68]. This multicomponent composition ensures the ability of cell extracts to reproduce a significant part of the regulatory properties characteristic of intact cells, while completely eliminating the risks of proliferation, uncontrolled differentiation, or possible oncogenic effects.

і структурних молекул – білки, нуклеїнові кислоти, ліпіди, вуглеводи, низькомолекулярні метаболіти, а також фрагменти органел [67, 68]. Такий багатокомпонентний склад забезпечує здатність клітинних екстрактів відтворювати значну частину регуляторних властивостей, характерних для інтактних клітин, водночас повністю усуваючи ризики проліферації, неконтрольованої диференціації чи можливих онкогенних ефектів.

Історично методи лізису клітин використовувалися у дослідницьких цілях для виділення органел, очищення білків або аналізу внутрішньоклітинних сигнальних шляхів. Однак поглиблене вивчення функціональних властивостей внутрішньоклітинних молекулярних комплексів показало, що вони мають істотну здатність модулювати запалення, апоптоз, ангіогенез, ремоделювання позаклітинного матриксу та метаболічні процеси. З огляду на це клітинні екстракти почали розглядатися не як технічний інструмент, а як самостійна терапевтична платформа з потенціалом активації ендogenous відновних реакцій у тканинах, пошкоджених різними патологічними факторами, включно з дією іонізуючого випромінювання.

На підставі даних низки досліджень встановлено, що клітинні екстракти демонструють виражений терапевтичний ефект у широкому спектрі моделей патологічних станів [69, 70, 71]. Зокрема, відзначено позитивний вплив на загоєння ран [72], відновлення серцевого м'язу після інфаркту й покращення стану при ішемічному інсульті [73, 74], модифікацію мікрооточення при гострому мієлоїдному лейкозі [75], зменшення активності гострого коліту [76], прискорення репарації при остеорадіонекрозі [77], корекцію нейродегенеративних порушень при хворобі Альцгеймера [78], регенерацію периферичних нервів, покращення метаболічних параметрів при ожирінні [79], зниження ступеня ушкодження печінки [80], відновлення функції при синдромі Шегрена, а також пом'якшення наслідків ушкодження слинних залоз, спричиненого іонізуючим опроміненням [81]. Сукупність цих даних свідчить про універсальність та багатовекторність дії клітинних екстрактів, які здатні впливати на ключові ланки патологічного процесу.

Особливої уваги заслуговує широкий спектр джерел, з яких можуть бути отримані клітинні екстракти. У дослідженнях проаналізовано екстракти, сформовані з клітин кісткового мозку [77, 81], стовбурових клітин кісткового мозку [82], мононуклеарних клітин кісткового мозку [73], стовбурових клітин жирової тканини [73, 83], тканини селезінки [83], ембріональних стовбурових клітин [84], стовбурових клітин слинних залоз [85], лейкоцитів периферичної крові [86], а також зі стовбурових клітин рослинного походження [87]. Різноманіття біологічних джерел формує значну варіабельність молекулярного складу, що дозволяє підібрати оптимальний тип клітинного екстракту для конкретної моделі ушкодження.

Таким чином, клітинні екстракти формують окремий клас регенеративних засобів, що поєднує переваги безклітинного підходу з високою біологічною ефективністю. Їх застосування мінімізує ризики, пов'язані з використанням живих клітин, та забезпечує доступність у виробництві, можливість стандартизації,

Historically, cell lysis methods have been used for research purposes to isolate organelles, purify proteins, or analyze intracellular signaling pathways. However, indepth studies of the functional properties of intracellular molecular complexes have shown that they have a significant ability to modulate inflammation, apoptosis, angiogenesis, extracellular matrix remodeling, and metabolic processes. In view of this, cell extracts began to be considered not as a technical tool, but as an independent therapeutic platform with the potential to activate endogenous repair reactions in tissues damaged by various pathological factors, including the effects of ionizing radiation.

Based on data from a number of studies, it has been established that cell extracts demonstrate a pronounced therapeutic effect in a wide range of pathological conditions [69, 70, 71]. In particular, a positive effect has been noted on wound healing wounds [72], restoration of the heart muscle after a heart attack and improvement of the condition in ischemic stroke [73, 74], modification of the microenvironment in acute myeloid leukemia [75], reduction of acute colitis activity [76], acceleration of repair in osteoradionecrosis [77], correction of neurodegenerative disorders in Alzheimer's disease [78], regeneration of peripheral nerves, improvement of metabolic parameters in obesity [79], reduction of liver damage [80], restoration of function in Sjogren's syndrome, and mitigation of the effects of salivary gland damage caused by ionizing radiation [81]. Taken together, these data indicate the versatility and multidirectional action of cell extracts, which are capable of influencing key links in the pathological process.

The wide range of sources from which cell extracts can be obtained deserves special attention. The studies analyzed extracts formed from bone marrow cells [77, 81], bone marrow stem cells [82], bone marrow mononuclear cells [73], adipose tissue stem cells [73, 83], spleen tissue [83], embryonic stem cells [84], salivary gland stem cells [85], peripheral blood leukocytes [86], and plant-derived stem cells [87]. The diversity of biological sources creates significant variability in molecular composition, allowing the selection of the optimal type of cell extract for a specific damage model.

Thus, cell extracts form a separate class of regenerative agents that combine the advantages of a cell-free approach with high biological efficacy. Their use minimizes the risks associated with the use of living cells and ensures availability in production, the possibility of standardization, reproducibility, and potential suitability for large-scale clinical use. At the same time, there is still a need for further research on optimizing methods of obtaining, controlling composition, standardizing activity, and evaluating long-term effects, which is critical for the implementation of this technology in clinical practice.

відтворюваність і потенційну придатність для масштабного клінічного використання. Разом з тим зберігається необхідність подальших досліджень щодо оптимізації методів отримання, контролю складу, стандартизації активності та оцінки довгострокових ефектів, що є критично важливим для впровадження цієї технології у клінічну практику.

4. Вплив методу лізису на молекулярний склад, біологічну активність та стандартизацію кріоекстрактів

При підготовці клітинних екстрактів вибір методу лізису визначає не лише ефективність руйнування клітинних структур, але й впливає на якісний, кількісний та функціональний профіль одержаних біомолекул. Встановлено, що спосіб порушення оболонки клітин зумовлює ступінь збереження просторової організації білків, активності ферментів, інтактності мембранних фрагментів, стабільності нуклеїнових кислот та рівня можливих домішок, що можуть утворюватися внаслідок внутрішньоклітинного автолізу або хімічної модифікації компонентів [20]. Таким чином, метод лізису виступає одним із ключових лімітуючих факторів для подальшої точності аналітичних вимірювань, чистоти препарату, біологічної активності екстракту та відтворюваності результатів у різних серіях виробництва (табл. 3). Розглянуті нижче технологічні підходи демонструють характерні патерни впливу на кінцевий продукт та відображають типовий спектр компромісів між виходом, збереженістю та специфічністю вилучених молекул.

Механічні методи, зокрема гомогенізація високого тиску (*high-pressure homogenization*) або подрібнення у присутності мікросфер (*bead-mill*), характеризуються здатністю забезпечувати повноцінне розривання клітинних стінок і мембран за рахунок інтенсивних зсувних напружень та колізійних ударів [88]. Такі умови сприяють високому виходу внутрішньоклітинного вмісту та ефективно застосовуються для обробки щільних суспензій та клітин із міцними оболонками. Водночас встановлено, що механічний вплив супроводжується локальним нагріванням та короткочасними піками тиску, які потенційно здатні спричинити часткову денатурацію білків, активацію ендогенних протеаз і фрагментацію нуклеїнових кислот. Крім того, надмірна механічна дія формує значні кількості клітинного детриту, а також може підвищувати в'язкість екстракту за рахунок вивільнення полімерних компонентів цитоскелета та нуклеїнових кислот, що ускладнює подальші етапи очищення та фільтрації [88]. Такі обмеження є типовими для процесів, орієнтованих на отримання функціонально активних білків або термолабільних молекул.

Кавітаційні методи, зокрема ультразвукова дезінтеграція, базуються на формуванні та колапсі мікробульбашок у рідині, що створює високі локальні напруження зсуву, ударні хвилі та мікрострумені. Оптимізація частоти, потужності та тривалості ультразвукового впливу дає змогу досягати високої ефективності руйнування клітин і цілеспрямованої екстракції гідрофобних компонентів, зокрема ліпідів, поліфенолів та інших низькомолекулярних сполук. Це робить ультразвук цінним інструментом для біотехнологічних

4. The effect of the lysis method on the molecular composition, biological activity and standardization of cryoextracts

When preparing cell extracts, the choice of lysis method determines not only the efficiency of cell structure destruction, but also affects the qualitative, quantitative, and functional profile of the biomolecules obtained. It has been established that the method of cell membrane disruption determines the degree of preservation of the spatial organization of proteins, enzyme activity, membrane fragment integrity, nucleic acid stability, and the level of possible impurities that may form as a result of intracellular autolysis or chemical modification of components [20]. Thus, the lysis method is one of the key limiting factors for the subsequent accuracy of analytical measurements, purity of the preparation, biological activity of the extract, and reproducibility of results in different production series (Table 3). The technological approaches discussed below demonstrate characteristic patterns of influence on the final product and reflect a typical range of compromises between yield, preservation, and specificity of the extracted molecules.

Mechanical methods, in particular *high-pressure homogenization* or grinding in the presence of microspheres (*bead mill*), are characterized by their ability to ensure complete rupture of cell walls and membranes due to intense shear stresses and collision impacts [88]. Such conditions promote high yield of intracellular content and are effectively used for processing dense suspensions and cells with strong membranes. At the same time, it has been established that mechanical impact is accompanied by local heating and short-term pressure peaks, which are potentially capable of causing partial protein denaturation, activation of endogenous proteases, and fragmentation of nucleic acids. In addition, excessive mechanical action forms significant amounts of cell debris and can also increase the viscosity of the extract due to the release of polymer components of the cytoskeleton and nucleic acids, which complicates further stages of purification and filtration [88]. Such limitations are typical for processes aimed at obtaining functionally active proteins or thermolabile molecules.

Cavitation methods, in particular ultrasonic disintegration, are based on the formation and collapse of microbubbles in a liquid, which creates high local shear stresses, shock waves, and microjets. Optimization of the frequency, power, and duration of ultrasonic exposure allows for highly efficient cell disruption and targeted extraction of hydrophobic components, including lipids, polyphenols, and other low-molecularweight compounds. This makes ultrasound a valuable tool for biotechnological processes involving microalgae, plant raw materials, and matrices with a high content of lipophilic molecules. At the same time, excessive cavitation intensity can cause the

процесів, пов'язаних із мікроводоростями, рослинною сировиною та матрицями з підвищеним вмістом ліпофільних молекул. Водночас надмірна інтенсивність кавітації може спричинити утворення локальних «гарячих точок» і вільних радикалів, здатних окиснювати або модифікувати термолабільні компоненти [89, 90, 91]. Зокрема, білки та пептиди із нестабільними доменами, а також деякі вітаміни, що легко піддаються окисненню, демонструють зниження функціональної активності у разі надмірного ультразвукового впливу. Таким чином, кавітаційний лізис потребує точного контролю параметрів, щоб досягти балансу між ефективністю руйнування клітин та мінімізацією uszkodження біомолекул.

Кріогенний лізис, що передбачає подрібнення тканин або клітин при наднизьких температурах, зокрема із застосуванням рідкого азоту або середовищ із температурою $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, забезпечує максимально можливе збереження чутливих структурних та функціональних компонентів. Низькі температури значно знижують активність ендогенних протеаз, ліпаз та нуклеаз, завдяки чому мінімізується неконтрольований автоліз і деградація білків, ферментів, екзосом та інших нанорозмірних структур [92]. Такий підхід є особливо релевантним у випадках, коли необхідно забезпечити інтактність висококонформаційних білків, мембранних рецепторів, сигнальних комплексів або летких ароматичних компонентів. Дослідження на прикладі спецій демонструють, що кріогенне подрібнення зберігає леткі ароматичні сполуки, тоді як екстракція мікроводоростей підтверджує збереження біологічно активних молекул у кріогенних екстрактах [92]. Саме це робить кріогенний підхід одним із найбільш щадних методів у випадках, коли кінцевий продукт повинен зберігати природну біоактивність і структуру.

Ферментативний лізис ґрунтується на застосуванні ферментів, здатних вибірково деградувати компоненти клітинних стінок або мембран, забезпечуючи високий рівень селективності та мінімізацію механічного стресу [29]. Встановлено, що при правильному доборі ферментів руйнуються лише необхідні структурні елементи, тоді як внутрішньоклітинні білки та інші цільові компоненти залишаються в умовах, близьких до фізіологічних, що знижує ризик їх часткової денатурації або функціональної втрати. Однак одним із основних обмежень є потенційне потрапляння залишкових ферментів або їхніх продуктів у кінцевий екстракт, що може ускладнювати очищення, створювати фонову активність та впливати на стабільність білків, особливо у процесах біофармацевтичної підготовки [29]. Тому ферментативні методи потребують ретельного контролю чистоти та додаткових етапів видалення ферментних домішок.

Хімічний лізис із використанням детергентів, лужних розчинів або інших сольобілізуючих агентів забезпечує максимально ефективне порушення мембранних структур та вивільнення внутрішньоклітинних компонентів [93]. Перевагою цього підходу є висока швидкість та можливість одержання комплексної суміші білків, ліпідів, нуклеїнових кислот і метаболітів без потреби у значному механічному впливі. Водночас використання хімічних реагентів пов'язане з ризиком

formation of local «hot spots» and free radicals capable of oxidizing or modifying thermolabile components [89, 90, 91]. In particular, proteins and peptides with unstable domains, as well as some vitamins that are easily oxidized, show a decrease in functional activity when exposed to excessive ultrasound. Thus, cavitation lysis requires precise control of parameters to achieve a balance between effective cell destruction and minimization of damage to biomolecules.

Cryogenic lysis, which involves the grinding of tissues or cells at ultra-low temperatures, in particular using liquid nitrogen or media at a temperature of $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, ensures the maximum possible preservation of sensitive structural and functional components. Low temperatures significantly reduce the activity of endogenous proteases, lipases, and nucleases, thereby minimizing uncontrolled autolysis and degradation of proteins, enzymes, exosomes, and other nanoscale structures [92]. This approach is particularly relevant in cases where it is necessary to ensure the integrity of highly conformational proteins, membrane receptors, signaling complexes, or volatile aromatic components. Research on the example of spices show that cryogenic grinding preserves volatile aromatic compounds, while microalgae extraction confirms the preservation of biologically active molecules in cryogenic extracts [92]. This is what makes the cryogenic approach one of the most gentle methods in cases where the final product must retain its natural bioactivity and structure.

Enzymatic lysis is based on the use of enzymes capable of selectively degrading components of cell walls or membranes, ensuring a high level of selectivity and minimizing mechanical stress [29]. It has been established that with the correct selection of enzymes, only the necessary structural elements are destroyed, while intracellular proteins and other target components remain in conditions close to physiological, which reduces the risk of their partial denaturation or functional loss. However, one of the main limitations is the potential entry of residual enzymes or their products into the final extract, which can complicate purification, create background activity, and affect protein stability, especially in biopharmaceutical preparation processes [29]. Therefore, enzymatic methods require careful control of purity and additional steps to remove enzyme impurities.

Chemical lysis using detergents, alkaline solutions, or other solubilizing agents provides the most effective disruption of membrane structures and release of intracellular components [93]. The advantage of this approach is its high speed and the ability to obtain a complex mixture of proteins, lipids, nucleic acids, and metabolites without the need for significant mechanical impact. At the same time, the use of chemical reagents is associated with the risk of residual concentrations that may be toxic or capable of causing structural modifications of sensitive molecules. For example, it has been established that anionic detergents can activate fibroblasts or induce an inflammatory response *in vivo* if they are not sufficiently removed from the final matrix [94]. This necessitates multistage washing, dialysis, or other detoxification procedures to ensure the safety and biological neutrality of the product.

присутності залишкових концентрацій, які можуть бути токсичними або здатні спричиняти структурні модифікації чутливих молекул. Наприклад, встановлено, що аніонні детергенти можуть активувати фібробласти або індукувати запальну відповідь *in vivo* при недостатньому їх видаленні з кінцевої матриці [94]. Це зумовлює необхідність багатоетапного промивання, діалізу або інших процедур детоксикації для забезпечення безпечності та біологічної нейтральності продукту.

Таблиця 3. Порівняльна характеристика методів лізису клітин та їх впливу на якісний склад екстракту
Table 3. Comparative characteristics of cell lysis methods and their impact on the qualitative composition of the extract

Технологія лізису Lysis technology	Очікуваний вплив на склад екстракту Expected impact on the composition of the extract
Механічні методи (гомогенізація під тиском, bead milling тощо) Mechanical methods (pressure homogenization, bead milling, etc.)	Забезпечують високу ефективність руйнування клітин, проте супроводжуються значним зсувним навантаженням і локальним перегрівом, що підвищує ризик денатурації білків та активації протеолізу. Унаслідок інтенсивного механічного впливу в одержаному екстракті зазвичай міститься велика кількість клітинного детриту, нуклеїнових кислот і мембранних фрагментів, що може ускладнювати подальші етапи очищення та впливати на якість кінцевого біопродукту. Provide high efficiency of cell disruption; however, they are accompanied by significant shear stress and local overheating, which increases the risk of protein denaturation and activation of proteolysis. As a result of intensive mechanical impact, the obtained extract usually contains a large amount of cell debris, nucleic acids, and membrane fragments, which may complicate further purification steps and affect the quality of the final bioproduct.
Кавітаційні методи (ультразвук, гідродинамічна кавітація) Cavitation methods (ultrasound, hydrodynamic cavitation)	Кавітаційні процеси під час ультразвукового чи гідродинамічного лізису супроводжуються утворенням бульбашок, які під час колапсу створюють локальні зони підвищеної температури та генерують реактивні радикали. За надмірної інтенсивності такого впливу можливе ушкодження термолабільних сполук, зокрема вітамінів, окремих пептидів і поліфенольних компонентів. Водночас за оптимально підібраних режимів кавітації забезпечується ефективне вилучення ліпідів та інших гідрофобних молекул із мінімальною зміною їхнього складу, що сприяє збереженню характерного профілю жирних кислот у кінцевому екстракті. Cavitation processes during ultrasonic or hydrodynamic lysis are accompanied by the formation of bubbles that, upon collapse, create local zones of elevated temperature and generate reactive radicals. With excessive intensity of such exposure, damage to thermolabile compounds is possible, including vitamins, certain peptides, and polyphenolic components. At the same time, under optimally selected cavitation conditions, efficient extraction of lipids and other hydrophobic molecules is ensured with minimal alteration of their composition, contributing to preservation of the characteristic fatty acid profile in the final extract.
Кріогенний лізис (кріопродіщення, лізис при температурі від $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) Cryogenic lysis (cryogrinding, lysis at temperatures from $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$)	Подрібнення, що здійснюється за температури близько $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ або з використанням рідкого азоту, забезпечує мінімізацію теплового й окисдативного ушкодження біомолекул. Значно краще зберігаються леткі та термолабільні компоненти, а також структурні білки й пептиди, чутливі до дії температури та активності ферментів. Низька температура істотно пригнічує роботу ендогенних протеаз, що зменшує деградацію екзосом та ферментів і сприяє отриманню екстракту з більшою збереженістю функціонально важливих компонентів. Grinding performed at temperatures around $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ or using liquid nitrogen ensures minimization of thermal and oxidative damage to biomolecules. Volatile and thermolabile components, as well as structural proteins and peptides sensitive to temperature and enzymatic activity, are preserved much better. Low temperature significantly suppresses the activity of endogenous proteases, which reduces degradation of exosomes and enzymes and contributes to obtaining an extract with greater preservation of functionally important components.
Ферментативний лізис Enzymatic lysis	Характеризується високою селективністю, оскільки дає змогу цілеспрямовано руйнувати клітинну стінку або мембрану при мінімальному механічному навантаженні. Зменшується ризик механічного ушкодження білків та інших структурно чутливих компонентів. Водночас застосування лізисних ферментів зумовлює те, що у складі отриманого екстракту можуть залишатися самі ферменти чи їхні домішки, що потенційно впливає на подальші етапи аналітичного дослідження або очищення біомолекул. It is characterized by high selectivity, as it enables targeted disruption of the cell wall or membrane with minimal mechanical stress. The risk of mechanical damage to proteins and other structurally sensitive components is reduced. At the same time, the use of lytic enzymes results in the possibility that the enzymes themselves or their impurities may remain in the obtained extract, which can potentially affect subsequent stages of analytical investigation or purification of biomolecules.

Продовження таблиці 3 / Continuation of Table 3

Хімічний лізис (детергенти, луги, солюбілізатори)	Забезпечує ефективне руйнування клітинних мембран і дозволяє швидко вивільнити широкий спектр внутрішньоклітинних компонентів. Проте застосування сильних лужних агентів або детергентів може призводити до повної денатурації білків, що істотно знижує їхню функціональну цінність. Додатковою проблемою є можливе збереження залишкових реагентів у матриці екстракту: детергенти та інші хімічні сполуки нерідко виявляються токсичними для клітин, здатними модифікувати поверхню біоматеріалу, змінювати активність ферментів і впливати на імуногенність, що ускладнює подальше використання отриманого біопродукту.
Chemical lysis (detergents, alkalis, solubilizers)	Ensures effective disruption of cell membranes and allows rapid release of a wide range of intracellular components. However, the use of strong alkaline agents or detergents may lead to complete protein denaturation, significantly reducing their functional value. An additional problem is the possible retention of residual reagents in the extract matrix: detergents and other chemical compounds are often toxic to cells, capable of modifying the surface of biomaterials, altering enzyme activity, and affecting immunogenicity, which complicates further use of the obtained bioproduct.

Загалом проведений аналіз свідчить, що вибір методу лізису є визначальним чинником формування молекулярного профілю кріоекстрактів, оскільки кожен підхід по-різному впливає на збереженість структурних білків, ферментів, мембранних компонентів, ліпідів, пептидів та низькомолекулярних метаболітів. Механічні й кавітаційні технології забезпечують високий вихід біоматеріалу, проте супроводжуються ризиками термомеханічного ушкодження та генерації значної кількості домішок. Ферментативні та хімічні методи дають змогу працювати за м'якіших умов, але потребують ретельного контролю домішок ферментів або залишкових реагентів. Натомість кріогенний лізис продемонстрував найбільш сприятливий профіль щодо збереження біологічно активних компонентів, мінімізації автолізу та стабільності нативної структури молекул, що робить його оптимальним варіантом для отримання високоякісних кріоекстрактів.

З позицій стандартизації виробництва перевага кріогенного методу полягає в його здатності відтворювано формувати стабільний та прогнозований склад екстракту, мінімізуючи варіабельність між серіями та забезпечуючи високу відповідність до вимог біоактивності, чистоти й безпечності. Інші технології лізису можуть застосовуватися для специфічних завдань, проте потребують додаткових етапів оптимізації та контролю, зокрема щодо домішок, цілісності білків та регуляції окисних процесів. Таким чином, встановлені закономірності підтверджують, що кріогенний підхід є найперспективнішим з погляду отримання стандартизованих біопрепаратів із високим рівнем біологічної активності.

ВИСНОВКИ

Сучасні методи лізису клітин та кріогенні технології забезпечують високоефективне вивільнення внутрішньоклітинних компонентів із збереженням їх біологічної активності. Механізми кріопшкодження – фазові переходи ліпідів, осмотичні та механічні зміни – формують умови для отримання стандартизованих тканинних кріоекстрактів. Такі екстракти містять широкий спектр ендогенних регуляторних молекул, здатних модулювати репаративні, імунологічні та цитопротекторні процеси.

Системний аналіз механічних, фізичних, хімічних, ферментативних і мікрофлюїдних стратегій лізису показує необхідність їхнього точного підбору залежно від типу тканини та чутливості цільових молекул. Поєднання різних технологічних підходів забезпечує оптимальний

In general, the analysis shows that the choice of lysis method is a determining factor in the formation of the molecular profile of cryoextracts, since each approach has a different effect on the preservation of structural proteins, enzymes, membrane components, lipids, peptides, and low-molecular-weight metabolites. Mechanical and cavitation technologies provide a high yield of biomaterial, but are accompanied by risks of thermomechanical damage and the generation of a significant amount of impurities.

Enzymatic and chemical methods allow for milder conditions, but require careful control of enzyme impurities or residual reagents. Cryogenic lysis, on the other hand, has demonstrated the most favorable profile in terms of preserving biologically active components, minimizing autolysis, and maintaining the stability of the native structure of molecules, making it the optimal option for obtaining high-quality cryoextracts.

From the standpoint of production standardization, the advantage of the cryogenic method lies in its ability to reproducibly form a stable and predictable extract composition, minimizing variability between batches and ensuring high compliance with bioactivity, purity, and safety requirements. Other lysis technologies can be used for specific tasks, but require additional optimization and control steps, particularly with regard to impurities, protein integrity, and oxidation control. Thus, the established patterns confirm that the cryogenic approach is the most promising in terms of obtaining standardized biological products with a high level of biological activity.

CONCLUSIONS

Modern methods of cell lysis and cryogenic technologies ensure highly efficient release of intracellular components while preserving their biological activity. Cryodamage mechanisms – phase transitions of lipids, osmotic and mechanical changes – form conditions for obtaining standardized tissue cryoextracts. Such extracts contain a wide range of endogenous regulatory molecules capable of modulating reparative, immunological, and cytoprotective processes.

A systematic analysis of mechanical, physical, chemical, enzymatic, and microfluidic lysis strategies shows the need for their careful selection depending on the tissue type and sensitivity of the target molecules. The combination of different technological approaches provides

баланс між ефективністю руйнування мембрани та збереженням нативної структури біомакромолекул, що є критично важливим для формування високоякісних терапевтичних безклітинних продуктів.

Порівняння криоекстрактів, секретому та інших безклітинних препаратів демонструє перспективність їхнього використання у регенеративній медицині як безпечної та стандартизованої альтернативи клітинній терапії. Біоактивні молекули цих препаратів здатні комплексно впливати на запалення, ангіогенез, ремоделювання тканин та відновлення функції після ушкодження. Подальші дослідження мають бути спрямовані на стандартизацію методів отримання, контроль складу й оцінку довгострокової ефективності.

Метод лізису є визначальним чинником формування молекулярної композиції та біологічної активності криоекстрактів. Механічні й кавітаційні технології забезпечують високий вихід, але супроводжуються ризиками термомеханічного ушкодження та накопичення домішок. Ферментативні та хімічні методи є селективними, проте потребують контролю залишкових реагентів і ферментів, натомість криогенний лізис забезпечує найкраще збереження нативної структури, мінімізацію ендогенної деградації й високу стабільність компонентів, що робить його найбільш придатним для отримання стандартизованих високоякісних криоекстрактів із відтворюваними біологічними властивостями.

an optimal balance between the efficiency of membrane destruction and the preservation of the native structure of biomacromolecules, which is critical for the formation of high-quality cell-free therapeutic products.

A comparison of cryoextracts, secretions, and other cell-free preparations demonstrates their promise in regenerative medicine as a safe and standardized alternative to cell therapy. The bioactive molecules of these preparations are capable of comprehensively affecting inflammation, angiogenesis, tissue remodeling, and restoration of function after damage. Further research should be aimed at standardizing methods of obtaining, controlling the composition, and evaluating long-term effectiveness.

The lysis method is a determining factor in the formation of the molecular composition and biological activity of cryoextracts. Mechanical and cavitation technologies provide high yield but are accompanied by risks of thermomechanical damage and accumulation of impurities. Enzymatic and chemical methods are selective, but require control of residual reagents and enzymes, while cryogenic lysis provides the best preservation of the native structure, minimization of endogenous degradation, and high stability of components, making it most suitable for obtaining standardized highquality cryoextracts with reproducible biological properties

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Vatsa P., Negi R., Ansari U.A., Khanna V.K., Pant A.B. Insights of extracellular vesicles of mesenchymal stem cells: a prospective cell-free regenerative medicine for neurodegenerative disorders. *Molecular Neurobiology*. 2022. Vol. 59, № 1. P. 459–474. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02603-7>
2. Ding Y., Li Y., Sun Z., Han X., Chen Y., Ge Y., Mao Z., Wang W. Cell-derived extracellular vesicles and membranes for tissue repair. *Journal of Nanobiotechnology*. 2021. Vol. 19, № 1. P. 368. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12951-021-01113-x>
3. Cottle C., Porter A.P., Lipat A., Turner-Lyles C., Nguyen J., Moll G., et al. Impact of cryopreservation and freeze-thawing on therapeutic properties of mesenchymal stromal/stem cells and other common cellular therapeutics. *Current Stem Cell Reports*. 2022. Vol. 8, № 2. P. 72–92. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40778-022-00212-1>
4. Anisa I., Irfan Y. A brief review of current strategies and advances in cryopreservation techniques. *Advances in Biotechnology & Microbiology*. 2024. Vol. 18, № 1. P. 555978. DOI: <https://doi.org/10.19080/AIBM.2024.17.555978>
5. Grigorov E., Kirov B., Marinov M.B., Galabov V. Review of microfluidic methods for cellular lysis. *Micromachines (Basel)*. 2021. Vol. 12, № 5. P. 498. DOI: <https://doi.org/10.3390/mi12050498>
6. Wada O.Z., Rashid N., Wijten P., Thornalley P., McKay G., Mackey H.R. Evaluation of cell disruption methods for protein and coenzyme Q10 quantification in purple non-sulfur bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 2024. Vol. 15. P. 1324099. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1324099>
7. Liu Y., Liu X., Cui Y., Yuan W. Ultrasound for microalgal cell disruption and product extraction: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2022. Vol. 87. P. 106054. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106054>
8. Asenjo J.A., Andrews B.A. Enzymatic cell lysis for product release. *Bioprocess Technology*. 1990. Vol. 9. P. 143–175.
9. Halchenko S.Ye. Extracts of cryopreserved xenogeneic organ fragments: production and biological effects. *Problems of Cryobiology*. 2005. Vol. 15, № 3. P. 403–406.
10. Гладких Ф.В., Лядова Т.І., Чиж М.О., Коморовський Р.Р., Бабаєва Г.Г., Матвієнко М.С. Кардіоселективність криобіотехнологічних засобів у терапії серцево-судинних захворювань. *Вінниця: ТВОРИ*. 2025. С. 384. DOI: <https://doi.org/10.46879/2025.4>
11. Trigo C.M., Rodrigues J.S., Camões S.P., Solá S., Miranda J.P. Mesenchymal stem cell secretome for regenerative medicine: where do we stand? *Journal of Advanced Research*. 2025. Vol. 70. P. 103–124. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2024.05.004>

REFERENCES

1. Vatsa P, Negi R, Ansari UA, Khanna VK, Pant AB. Insights of extracellular vesicles of mesenchymal stem cells: a prospective cell-free regenerative medicine for neurodegenerative disorders. *Molecular Neurobiology*. 2022;59(1):459–74. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02603-7>
2. Ding Y, Li Y, Sun Z, Han X, Chen Y, Ge Y, et al. Cell-derived extracellular vesicles and membranes for tissue repair. *Journal of Nanobiotechnology*. 2021;19(1):368. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12951-021-01113-x>
3. Cottle C, Porter AP, Lipat A, Turner-Lyles C, Nguyen J, Moll G, et al. Impact of cryopreservation and freeze-thawing on therapeutic properties of mesenchymal stromal/stem cells and other common cellular therapeutics. *Current Stem Cell Reports*. 2022;8(2):72–92. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40778-022-00212-1>
4. Anisa I, Irfan Y. A brief review of current strategies and advances in cryopreservation techniques. *Advances in Biotechnology & Microbiology*. 2024;18(1):555978. DOI: <https://doi.org/10.19080/AIBM.2024.17.555978>
5. Grigorov E, Kirov B, Marinov MB, Galabov V. Review of microfluidic methods for cellular lysis. *Micromachines (Basel)*. 2021;12(5):498. DOI: <https://doi.org/10.3390/mi12050498>
6. Wada OZ, Rashid N, Wijten P, Thornalley P, McKay G, Mackey HR. Evaluation of cell disruption methods for protein and coenzyme Q10 quantification in purple non-sulfur bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 2024;15:1324099. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1324099>
7. Liu Y, Liu X, Cui Y, Yuan W. Ultrasound for microalgal cell disruption and product extraction: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2022;87:106054. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106054>
8. Asenjo JA, Andrews BA. Enzymatic cell lysis for product release. *Bioprocess Technology*. 1990;9:143–75.
9. Halchenko SYe. Extracts of cryopreserved xenogeneic organ fragments: production and biological effects. *Problems of Cryobiology*. 2005;15(3):403–6.
10. Hladkykh FV, Liadova TI, Chyzh MO, Komorovskyi RR, Babaieva HH, Matvieienko MS. Cardiospecificity of cryobiotechnological agents in the therapy of cardiovascular diseases. *Vinnitsia: TVORY*; 2025:384. (in Ukrainian). DOI: <https://doi.org/10.46879/2025.4>
11. Trigo CM, Rodrigues JS, Camões SP, Solá S, Miranda JP. Mesenchymal stem cell secretome for regenerative medicine: where do we stand? *Journal of Advanced Research*. 2025;70:103–24. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2024.05.004>

12. González-González A, García-Sánchez D, Dotta M, Rodríguez-Rey J.C., Pérez-Campo F.M. Mesenchymal stem cells secretome: the cornerstone of cell-free regenerative medicine. *World Journal of Stem Cells*. 2020. Vol. 12, № 12. P. 1529–1552. DOI: <https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i12.1529>
13. Zununi Vahed S, Hejazian S.M., Bakari W.N., Landon R., Gueguen V., Meddahi-Pellé A., et al. Milking mesenchymal stem cells: updated protocols for cell lysate, secretome, and exosome extraction, and comparative analysis of their therapeutic potential. *Methods*. 2025. Vol. 238. P. 40–60. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2025.03.004>
14. Гладких Ф.В. Протизапальні властивості диклофенаку натрію на тлі комбінованого застосування з криоконсервованим екстрактом плаценти в експерименті. *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2021. Т. 31, № 4. С. 364–367. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo31.04.364>
15. Hladkykh F.V. The effect of meloxicam and cryopreserved placenta extract on initial inflammatory response (an experimental study). *Česká a Slovenská Farmacie*. 2021. Vol. 70, № 5. P. 179–185. DOI: <https://doi.org/10.5817/CSF2021-5-179>
16. Чиж М.О., Белочкіна І.В., Глоба В.Ю., Слета І.В., Михайлова І.П., Гладких, Ф.В. Ультразвукове дослідження серця щурів після експериментального ураження епінефрином та застосування ксеноекстракту серця. *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія Медицина*. 2024. Т. 32, № 2. С. 185–197. DOI: <https://doi.org/10.26565/2313-6693-2024-49-06>
17. Chouaib B, Haack-Sørensen M, Chaubron F, Cuisinier F, Collart-Dutilleul P.Y. Towards the standardization of mesenchymal stem cell secretome-derived product manufacturing for tissue regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24. P. 12594. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms241612594>
18. Чиж М.О., Гальченко С.Є., Гладких Ф.В., Бизов В.В., Рогоза Л.А., Белочкіна І.В., та ін. Безклітинні криоконсервовані біологічні засоби: технологія отримання та визначення складу : монографія. *Вінниця: Теори*. 2024. С. 264. DOI: <https://doi.org/10.46879/2024.1>
19. Чиж М.О., Гальченко С.Є., Гладких Ф.В., Лядова Т.І., Бизов В.В., Рогоза Л.А., та ін. Метаболічні, регенеративні та імунологічні властивості водно-солевих екстрактів криоконсервованих тканин : монографія. *Вінниця: Теори*. 2025. С. 296. DOI: <https://doi.org/10.46879/2025.5>
20. Shehadul Islam M, Aryasomayajula A, Selvaganapathy P.R. A review on macroscale and microscale cell lysis methods. *Micromachines (Basel)*. 2017. Vol. 8, № 3. P. 83. DOI: <https://doi.org/10.3390/mi8030083>
21. Nan L, Jiang Z, Wei X. Emerging microfluidic devices for cell lysis: a review. *Lab on a Chip*. 2014. Vol. 14, № 6. P. 1060–1073. DOI: <https://doi.org/10.1039/c3lc51133b>
22. Taskova R.M., Zorn H., Krings U., Bouws H., Berger R.G. A comparison of cell wall disruption techniques for the isolation of intracellular metabolites from *Pleurotus* and *Lepista* sp. *Zeitschrift für Naturforschung C – Journal of Biosciences*. 2006. Vol. 61, № 5–6. P. 347–350. DOI: <https://doi.org/10.1515/znc-2006-5-608>
23. Ho C.W., Tan W.S., Yap W.B., Ling T.C., Tey B.T. Comparative evaluation of different cell disruption methods for the release of recombinant hepatitis B core antigen from *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2008. Vol. 13. P. 577–583. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12257-008-0020-9>
24. Anand H., Balasundaram B., Pandit A.B., Harrison S.T.L. The effect of chemical pretreatment combined with mechanical disruption on the extent of disruption and release of intracellular protein from *E. coli*. *Biochemical Engineering Journal*. 2007. Vol. 35. P. 166–173. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.01.011>
25. Balasundaram B., Harrison S., Bracewell D.G. Advances in product release strategies and impact on bioprocess design. *Trends in Biotechnology*. 2009. Vol. 27, № 8. P. 477–485. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.04.004>
26. Capocelli M., Prisciandaro M., Lancia A., Musmarra D. Comparison between hydrodynamic and acoustic cavitation in microbial cell disruption. *Chemical Engineering Transactions*. 2014. Vol. 38. DOI: <https://doi.org/10.3303/CET1438003>
27. Lee A.K., Lewis D.M., Ashman P.J. Microalgal cell disruption by hydrodynamic cavitation for the production of biofuels. *Journal of Applied Phycology*. 2015. Vol. 27. P. 1881–1889. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0483-3>
28. Byreddy A.R., Gupta A., Barrow C.J., Puri M. Comparison of cell disruption methods for improving lipid extraction from thraustochytrid strains. *Marine Drugs*. 2015. Vol. 13, № 8. P. 5111–5127. DOI: <https://doi.org/10.3390/md13085111>
29. Salazar O., Asenjo J.A. Enzymatic lysis of microbial cells. *Biotechnology Letters*. 2007. Vol. 29, № 7. P. 985–994. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9345-2>
30. Berasaluce A., Matthys L., Mujika J., Antofiana-Diez M., Valero A., Agirregabiria M. Bead beating-based continuous flow cell lysis
31. González-González A, García-Sánchez D, Dotta M, Rodríguez-Rey J.C., Pérez-Campo F.M. Mesenchymal stem cells secretome: the cornerstone of cell-free regenerative medicine. *World Journal of Stem Cells*. 2020;12(12):1529–52. DOI: <https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i12.1529>
32. Zununi Vahed S, Hejazian SM, Bakari WN, Landon R, Gueguen V, Meddahi-Pellé A, et al. Milking mesenchymal stem cells: updated protocols for cell lysate, secretome, and exosome extraction, and comparative analysis of their therapeutic potential. *Methods*. 2025;238:40–60. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2025.03.004>
33. Hladkykh F.V. Anti-inflammatory properties of diclofenac sodium against the background of combined use with cryopreserved placenta extract in an experiment. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2021;31(4):364–7. (in Ukrainian). DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo31.04.364>
34. Hladkykh F.V. The effect of meloxicam and cryopreserved placenta extract on initial inflammatory response (an experimental study). *Česká a Slovenská Farmacie*. 2021;70(5):179–85. DOI: <https://doi.org/10.5817/CSF2021-5-179>
35. Chyzh MO, Belochkina IV, Globa VYu, Sleta IV, Mikhailova IP, Hladkykh FV. Ultrasound examination of rat hearts after experimental epinephrine-induced damage and the application of heart xenoextract. *The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University. Series Medicine*. 2024;32(2):185–97. DOI: <https://doi.org/10.26565/2313-6693-2024-49-06>
36. Chouaib B, Haack-Sørensen M, Chaubron F, Cuisinier F, Collart-Dutilleul PY. Towards the standardization of mesenchymal stem cell secretome-derived product manufacturing for tissue regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24:12594. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms241612594>
37. Chyzh MO, Halchenko SYe, Hladkykh FV, Byzov VV, Rohoza LA, Belochkina IV, et al. Cell-free cryopreserved biological agents: production technology and composition determination. *Vinnitsia: TVORY*. 2024;264. (in Ukrainian). DOI: <https://doi.org/10.46879/2024.1>
38. Chyzh MO, Halchenko SYe, Hladkykh FV, Liadova TI, Byzov VV, Rohoza LA, et al. Metabolic, regenerative and immunological properties of water-salt extracts of cryopreserved tissues. *Vinnitsia: TVORY*. 2025;296. (in Ukrainian). DOI: <https://doi.org/10.46879/2025.5>
39. Shehadul Islam M, Aryasomayajula A, Selvaganapathy PR. A review on macroscale and microscale cell lysis methods. *Micromachines (Basel)*. 2017;8(3):83. DOI: <https://doi.org/10.3390/mi8030083>
40. Nan L, Jiang Z, Wei X. Emerging microfluidic devices for cell lysis: a review. *Lab on a Chip*. 2014;14(6):1060–73. DOI: <https://doi.org/10.1039/c3lc51133b>
41. Taskova RM, Zorn H, Krings U, Bouws H, Berger RG. A comparison of cell wall disruption techniques for the isolation of intracellular metabolites from *Pleurotus* and *Lepista* sp. *Zeitschrift für Naturforschung C – Journal of Biosciences*. 2006;61(5–6):347–50. DOI: <https://doi.org/10.1515/znc-2006-5-608>
42. Ho CW, Tan WS, Yap WB, Ling TC, Tey BT. Comparative evaluation of different cell disruption methods for the release of recombinant hepatitis B core antigen from *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2008;13:577–83. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12257-008-0020-9>
43. Anand H, Balasundaram B, Pandit AB, Harrison STL. The effect of chemical pretreatment combined with mechanical disruption on the extent of disruption and release of intracellular protein from *E. coli*. *Biochemical Engineering Journal*. 2007;35:166–73. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.01.011>
44. Balasundaram B, Harrison S, Bracewell DG. Advances in product release strategies and impact on bioprocess design. *Trends in Biotechnology*. 2009;27(8):477–85. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.04.004>
45. Capocelli M, Prisciandaro M, Lancia A, Musmarra D. Comparison between hydrodynamic and acoustic cavitation in microbial cell disruption. *Chemical Engineering Transactions*. 2014;38. DOI: <https://doi.org/10.3303/CET1438003>
46. Lee AK, Lewis DM, Ashman PJ. Microalgal cell disruption by hydrodynamic cavitation for the production of biofuels. *Journal of Applied Phycology*. 2015;27:1881–9. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0483-3>
47. Byreddy AR, Gupta A, Barrow CJ, Puri M. Comparison of cell disruption methods for improving lipid extraction from thraustochytrid strains. *Marine Drugs*. 2015;13(8):5111–27. DOI: <https://doi.org/10.3390/md13085111>
48. Salazar O, Asenjo JA. Enzymatic lysis of microbial cells. *Biotechnology Letters*. 2007;29(7):985–94. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9345-2>
49. Berasaluce A, Matthys L, Mujika J, Antofiana-Diez M, Valero A, Agirregabiria M. Bead beating-based continuous flow cell lysis

- lysis in a microfluidic device. *RSC Advances*. 2015. Vol. 5. P. 22350–22355. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5RA01251A>
31. Tsougeni K., Papadakis G., Gianneli M., Grammoustianou A., Constantoudis V., Dupuy B., et al. Plasma nanotextured polymeric lab-on-a-chip for highly efficient bacteria capture and lysis. *Lab on a Chip*. 2016. Vol. 16, № 1. P. 120–131. DOI: <https://doi.org/10.1039/c5lc01217a>
32. Buser J.R., Zhang X., Byrnes S.A., Ladd P.D., Heiniger E.K., Wheeler M.D., et al. A disposable chemical heater and dry enzyme preparation for lysis and extraction of DNA and RNA from microorganisms. *Analytical Methods*. 2016. Vol. 8, № 14. P. 2880–2886. DOI: <https://doi.org/10.1039/c6ay00107f>
33. Kashyap A., Autebert J., Delamarche E., Kaigala G.V. Selective local lysis and sampling of live cells for nucleic acid analysis using a microfluidic probe. *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6. P. 29579. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep29579>
34. Huang S.H., Hung L.Y., Lee G.B. Continuous nucleus extraction by optically-induced cell lysis on a batch-type microfluidic platform. *Lab on a Chip*. 2016. Vol. 16, № 8. P. 1447–1456. DOI: <https://doi.org/10.1039/c5lc01284h>
35. Quinn P.J. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. *Cryobiology*. 1985. Vol. 22, № 2. P. 128–146. DOI: [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(85\)90167-1](https://doi.org/10.1016/0011-2240(85)90167-1)
36. Crowe J.H., Tablin F., Tsvetkova N., Oliver A.E., Walker N., Crowe L.M. Are lipid phase transitions responsible for chilling damage in human platelets? *Cryobiology*. 1999. Vol. 38, № 3. P. 180–191. DOI: <https://doi.org/10.1006/cryo.1998.2137>
37. Upadhyay V.R., Ramesh V., Dewry R.K., Kumar G., Raval K., Patoliya P. Implications of cryopreservation on structural and functional attributes of bovine spermatozoa: an overview. *Andrologia*. 2021. Vol. 53, № 8. P. e14154. DOI: <https://doi.org/10.1111/and.14154>
38. Williams W.P. Cold-induced lipid phase transitions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 1990. Vol. 326, № 1237. P. 555–567. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.1990.0031>
39. Drobnis E.Z., Crowe L.M., Berger T., Anchordoguy T.J., Overstreet J.W., Crowe J.H. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *Journal of Experimental Zoology*. 1993. Vol. 265, № 4. P. 432–437. DOI: <https://doi.org/10.1002/jez.1402650413>
40. Henkelman S., Lagerberg J.W., Graaff R., Rakhorst G., Van Oeveren W. The effects of cryopreservation on red blood cell rheologic properties. *Transfusion*. 2010. Vol. 50, № 11. P. 2393–2401. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2010.02730.x>
41. Chang T., Zhao G. Ice inhibition for cryopreservation: materials, strategies, and challenges. *Advanced Science (Weinheim)*. 2021. Vol. 8, № 6. P. 2002425. DOI: <https://doi.org/10.1002/advs.202002425>
42. Hoffmann N.E., Bischof J.C. The cryobiology of cryosurgical injury. *Urology*. 2002. Vol. 60, № 2 (Suppl. 1). P. 40–49. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(02\)01683-7](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(02)01683-7)
43. Huebinger J., Han H.M., Hofnagel O., Vetter I.R., Bastiaens P.I., Grabenbauer M. Direct measurement of water states in cryopreserved cells reveals tolerance toward ice crystallization. *Biophysical Journal*. 2016. Vol. 110, № 4. P. 840–849. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.09.029>
44. Pegg D.E. The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs. *Cryobiology*. 2010. Vol. 60, № 3 (Suppl.). P. S36–S44. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.02.003>
45. Gao D., Critser J.K. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR Journal*. 2000. Vol. 41, № 4. P. 187–196. DOI: <https://doi.org/10.1093/ilar.41.4.187>
46. Jin B., Seki S., Paredes E., Qiu J., Shi Y., Zhang Z., et al. Intracellular ice formation in mouse zygotes and early morulae vs. cooling rate and temperature: experimental vs. theory. *Cryobiology*. 2016. Vol. 73, № 2. P. 181–186. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.07.014>
47. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*. 1977. Vol. 14, № 3. P. 251–272. DOI: [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(77\)90175-4](https://doi.org/10.1016/0011-2240(77)90175-4)
48. Poisson J.S., Acker J.P., Briard J.G., Meyer J.E., Ben R.N. Modulating intracellular ice growth with cell-permeating small-molecule ice recrystallization inhibitors. *Langmuir*. 2019. Vol. 35, № 23. P. 7452–7458. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02126>
49. Vizoso F.J., Eiro N., Cid S., Schneider J., Perez-Fernandez R. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017. Vol. 18, № 9. P. 1852. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18091852>
50. Гладких Ф.В. Мезенхімальні стовбурові клітини: екзосоми та кондиціоновані середовища як інноваційні стратегії у лікуванні хворих на аутоімунні захворювання. *Клінічна та профілактична медицина України*. 2023. Т. 6 (28). С. 121–130. DOI: <https://doi.org/10.31612/2616-4868.6.2023.15>
51. Гладких Ф.В. Безклітинні біологічні засоби: фокус на кондиціоновані середовища мезенхімальних стовбурових клітин. *Одеський медичний журнал*. 2023. № 185 (4). С. 75–82. DOI: <https://doi.org/10.32782/2226-2008-2023-4-15>
- in a microfluidic device. *RSC Advances*. 2015;5:22350–5. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5RA01251A>
31. Tsougeni K, Papadakis G, Gianneli M, Grammoustianou A, Constantoudis V, Dupuy B, et al. Plasma nanotextured polymeric lab-on-a-chip for highly efficient bacteria capture and lysis. *Lab on a Chip*. 2016;16(1):120–31. DOI: <https://doi.org/10.1039/c5lc01217a>
32. Buser JR, Zhang X, Byrnes SA, Ladd PD, Heiniger EK, Wheeler MD, et al. A disposable chemical heater and dry enzyme preparation for lysis and extraction of DNA and RNA from microorganisms. *Analytical Methods*. 2016;8(14):2880–6. DOI: <https://doi.org/10.1039/c6ay00107f>
33. Kashyap A, Autebert J, Delamarche E, Kaigala GV. Selective local lysis and sampling of live cells for nucleic acid analysis using a microfluidic probe. *Scientific Reports*. 2016;6:29579. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep29579>
34. Huang SH, Hung LY, Lee GB. Continuous nucleus extraction by optically-induced cell lysis on a batch-type microfluidic platform. *Lab on a Chip*. 2016;16(8):1447–56. DOI: <https://doi.org/10.1039/c5lc01284h>
35. Quinn PJ. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. *Cryobiology*. 1985;22(2):128–46. DOI: [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(85\)90167-1](https://doi.org/10.1016/0011-2240(85)90167-1)
36. Crowe JH, Tablin F, Tsvetkova N, Oliver AE, Walker N, Crowe LM. Are lipid phase transitions responsible for chilling damage in human platelets? *Cryobiology*. 1999;38(3):180–91. DOI: <https://doi.org/10.1006/cryo.1998.2137>
37. Upadhyay VR, Ramesh V, Dewry RK, Kumar G, Raval K, Patoliya P. Implications of cryopreservation on structural and functional attributes of bovine spermatozoa: an overview. *Andrologia*. 2021;53(8):e14154. DOI: <https://doi.org/10.1111/and.14154>
38. Williams WP. Cold-induced lipid phase transitions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 1990;326(1237):555–67. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.1990.0031>
39. Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy TJ, Overstreet JW, Crowe JH. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *Journal of Experimental Zoology*. 1993;265(4):432–7. DOI: <https://doi.org/10.1002/jez.1402650413>
40. Henkelman S, Lagerberg JW, Graaff R, Rakhorst G, Van Oeveren W. The effects of cryopreservation on red blood cell rheologic properties. *Transfusion*. 2010;50(11):2393–401. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2010.02730.x>
41. Chang T, Zhao G. Ice inhibition for cryopreservation: materials, strategies, and challenges. *Advanced Science (Weinheim)*. 2021;8(6):2002425. DOI: <https://doi.org/10.1002/advs.202002425>
42. Hoffmann NE, Bischof JC. The cryobiology of cryosurgical injury. *Urology*. 2002;60(2 Suppl. 1):40–9. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(02\)01683-7](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(02)01683-7)
43. Huebinger J, Han HM, Hofnagel O, Vetter IR, Bastiaens PI, Grabenbauer M. Direct measurement of water states in cryopreserved cells reveals tolerance toward ice crystallization. *Biophysical Journal*. 2016;110(4):840–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.09.029>
44. Pegg DE. The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs. *Cryobiology*. 2010;60(3 Suppl.):S36–44. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.02.003>
45. Gao D, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR Journal*. 2000;41(4):187–96. DOI: <https://doi.org/10.1093/ilar.41.4.187>
46. Jin B, Seki S, Paredes E, Qiu J, Shi Y, Zhang Z, et al. Intracellular ice formation in mouse zygotes and early morulae vs. cooling rate and temperature: experimental vs. theory. *Cryobiology*. 2016;73(2):181–6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.07.014>
47. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*. 1977;14(3):251–72. DOI: [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(77\)90175-4](https://doi.org/10.1016/0011-2240(77)90175-4)
48. Poisson JS, Acker JP, Briard JG, Meyer JE, Ben RN. Modulating intracellular ice growth with cell-permeating small-molecule ice recrystallization inhibitors. *Langmuir*. 2019;35(23):7452–8. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02126>
49. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(9):1852. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18091852>
50. Hladkykh FV. Mesenchymal stem cells: exosomes and conditioned media as innovative strategies in the treatment of patients with autoimmune diseases. *Clinical and Preventive Medicine of Ukraine*. 2023;6(28):121–30. (in Ukrainian). DOI: <https://doi.org/10.31612/2616-4868.6.2023.15>
51. Hladkykh FV. Cell-free biological agents: focus on conditioned media of mesenchymal stem cells. *Odesa Medical Journal*. 2023;185(4):75–82. (in Ukrainian). DOI: <https://doi.org/10.32782/2226-2008-2023-4-15>

52. Матвєєнко М.С., Гладких Ф.В., Олексюк О.Б. Терапевтичний потенціал екзосом із мезенхімальних стромальних клітин при сепсисі. *Каразінський імунологічний журнал*. 2024. Т. 7, № 1 (13). С. 84–97. DOI: <https://doi.org/10.26565/3083-5615-2024-13-09>
53. Beer L., Mildner M., Ankersmit H.J. Cell secretome-based drug substances in regenerative medicine: when regulatory affairs meet basic science. *Annals of Translational Medicine*. 2017. Vol. 5, № 7. P. 170. DOI: <https://doi.org/10.21037/atm.2017.03.50>
54. Docheva D., Popov C., Mutschler W., Schieker M. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2007. Vol. 11, № 1. P. 21–38. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00001.x>
55. Rüster B., Göttig S., Ludwig R.J., Bistrrian R., Müller S., Seifried E., et al. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood*. 2006. Vol. 108, № 12. P. 3938–3944. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-025098>
56. Teo G.S., Ankrum J.A., Martinelli R., Boetto S.E., Simms K., Sciuto T.E., et al. Mesenchymal stem cells transigrate between and through TNF- α -activated endothelial cells via leukocyte-like and novel mechanisms. *Stem Cells*. 2012. Vol. 30, № 11. P. 2472–2486. DOI: <https://doi.org/10.1002/stem.1198>
57. Jiang W., Ma A., Wang T., Han K., Liu Y., Zhang Y., et al. Intravenous transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac performance after acute myocardial ischemia in female rats. *Transplant International*. 2006. Vol. 19, № 7. P. 570–580. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2006.00307.x>
58. Gnecci M., Zhang Z., Ni A., Dzau V.J. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circulation Research*. 2008. Vol. 103, № 11. P. 1204–1219. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.176826>
59. Yu S., Kong D., Lu B., Pan Y., Zeng Z., Fu Y., et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as cell-free therapeutics: mechanistic insights and engineering strategies for liver disease treatment. *Stem Cell Research & Therapy*. 2025. Vol. 16, № 1. P. 652. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13287-025-04747-y>
60. Eiró N., Sendon-Lago J., Seoane S., Bermúdez M.A., Lamelas M.L., Garcia-Caballero T., et al. Potential therapeutic effect of the secretome from human uterine cervical stem cells against cancer and stromal cells compared with adipose tissue stem cells. *Oncotarget*. 2014. Vol. 5, № 21. P. 10692–10708. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2530>
61. Bermudez M.A., Sendon-Lago J., Eiró N., Treviño M., Gonzalez F., Yebra-Pimentel E., et al. Corneal epithelial wound healing and bactericidal effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2015. Vol. 56, № 2. P. 983–992. DOI: <https://doi.org/10.1167/iovs.14-15859>
62. Bermudez M.A., Sendon-Lago J., Seoane S., Eiró N., Gonzalez F., Saa J., et al. Anti-inflammatory effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells in uveitis. *Experimental Eye Research*. 2016. Vol. 149. P. 84–92. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.06.022>
63. Osugi M., Katagiri W., Yoshimi R., Inukai T., Hibi H., Ueda M. Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects. *Tissue Engineering Part A*. 2012. Vol. 18, № 13–14. P. 1479–1489. DOI: <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2011.0325>
64. Kim D.K., Nishida H., An S.Y., Shetty A.K., Bartosh T.J., Prockop D.J. Chromatographically isolated CD63+CD81+ extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells rescue cognitive impairments after TBI. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2016. Vol. 113, № 1. P. 170–175. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1522297113>
65. Maguire G. Stem cell therapy without the cells. *Communicative & Integrative Biology*. 2013. Vol. 6, № 6. P. e26631. DOI: <https://doi.org/10.4161/cib.26631>
66. Justewicz D.M., Shokes J.E., Reavis B., Boyd S.A., Burnette T.B., Halberstadt C.R., et al. Characterization of the human smooth muscle cell secretome for regenerative medicine. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2012. Vol. 18, № 10. P. 797–816. DOI: <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2012.0054>
67. Su X., Upadhyay A., Tran S.D., Lin Z. Cell-free therapies: the use of cell extracts to mitigate irradiation-injured salivary glands. *Biology (Basel)*. 2023. Vol. 12, № 2. P. 305. DOI: <https://doi.org/10.3390/biology12020305>
68. Fang D., Hu S., Liu Y., Quan V.H., Seuntjens J., Tran S.D. Identification of the active components in bone marrow soup: a mitigator against irradiation-injury to salivary glands. *Scientific Reports*. 2015. Vol. 5. P. 16017. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep16017>
69. Гладких Ф.В., Кошурба І.В., Чиж М.О. Характеристика антиульцерогенної активності криоекстракту плаценти при гострому та хронічному ураженні шлунка. *Сучасні медичні технології*. 2023. № 1 (56). С. 62–68. DOI: [https://doi.org/10.34287/MMT.1\(56\).2023.10](https://doi.org/10.34287/MMT.1(56).2023.10)
70. Кошурба І.В., Гладких Ф.В., Чиж М.О. Модуляція ліпопероксидації та енергетичного обміну в слизовій оболонці шлунка як механізм активності криоекстракту плаценти в загостренні стрес-індукованого ерозивно-виразкового ушкодження. *Гастроентерологія*. 2022. Т. 56, № 3. С. 149–155. DOI: <https://doi.org/10.22141/2308-2097.56.3.2022.503>
52. Matvieienko MS, Hladkykh FV, Oleksiuk OB. Therapeutic potential of exosomes from mesenchymal stromal cells in sepsis. *The Karazin Journal of Immunology*. 2024;7(13):84–97. DOI: <https://doi.org/10.26565/3083-5615-2024-13-09>
53. Beer L, Mildner M, Ankersmit HJ. Cell secretome-based drug substances in regenerative medicine: when regulatory affairs meet basic science. *Annals of Translational Medicine*. 2017;5(7):170. DOI: <https://doi.org/10.21037/atm.2017.03.50>
54. Docheva D, Popov C, Mutschler W, Schieker M. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2007;11(1):21–38. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00001.x>
55. Rüster B, Göttig S, Ludwig R J, Bistrrian R, Müller S, Seifried E, et al. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood*. 2006;108(12):3938–44. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-025098>
56. Teo GS, Ankrum JA, Martinelli R, Boetto SE, Simms K, Sciuto TE, et al. Mesenchymal stem cells transigrate between and through TNF- α -activated endothelial cells via leukocyte-like and novel mechanisms. *Stem Cells*. 2012;30(11):2472–86. DOI: <https://doi.org/10.1002/stem.1198>
57. Jiang W, Ma A, Wang T, Han K, Liu Y, Zhang Y, et al. Intravenous transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac performance after acute myocardial ischemia in female rats. *Transplant International*. 2006;19(7):570–80. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2006.00307.x>
58. Gnecci M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circulation Research*. 2008;103(11):1204–19. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.176826>
59. Yu S, Kong D, Lu B, Pan Y, Zeng Z, Fu Y, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as cell-free therapeutics: mechanistic insights and engineering strategies for liver disease treatment. *Stem Cell Research & Therapy*. 2025;16(1):652. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13287-025-04747-y>
60. Eiró N, Sendon-Lago J, Seoane S, Bermúdez MA, Lamelas ML, Garcia-Caballero T, et al. Potential therapeutic effect of the secretome from human uterine cervical stem cells against cancer and stromal cells compared with adipose tissue stem cells. *Oncotarget*. 2014;5(21):10692–708. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2530>
61. Bermudez MA, Sendon-Lago J, Eiró N, Treviño M, Gonzalez F, Yebra-Pimentel E, et al. Corneal epithelial wound healing and bactericidal effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2015;56(2):983–92. DOI: <https://doi.org/10.1167/iovs.14-15859>
62. Bermudez MA, Sendon-Lago J, Seoane S, Eiró N, Gonzalez F, Saa J, et al. Anti-inflammatory effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells in uveitis. *Experimental Eye Research*. 2016;149:84–92. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.06.022>
63. Osugi M, Katagiri W, Yoshimi R, Inukai T, Hibi H, Ueda M. Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects. *Tissue Engineering Part A*. 2012;18(13–14):1479–89. DOI: <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2011.0325>
64. Kim DK, Nishida H, An SY, Shetty AK, Bartosh TJ, Prockop DJ. Chromatographically isolated CD63+CD81+ extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells rescue cognitive impairments after TBI. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2016;113(1):170–5. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1522297113>
65. Maguire G. Stem cell therapy without the cells. *Communicative & Integrative Biology*. 2013;6(6):e26631. DOI: <https://doi.org/10.4161/cib.26631>
66. Justewicz DM, Shokes JE, Reavis B, Boyd SA, Burnette TB, Halberstadt CR, et al. Characterization of the human smooth muscle cell secretome for regenerative medicine. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2012;18(10):797–816. DOI: <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2012.0054>
67. Su X, Upadhyay A, Tran SD, Lin Z. Cell-free therapies: the use of cell extracts to mitigate irradiation-injured salivary glands. *Biology (Basel)*. 2023;12(2):305. DOI: <https://doi.org/10.3390/biology12020305>
68. Fang D, Hu S, Liu Y, Quan VH, Seuntjens J, Tran SD. Identification of the active components in bone marrow soup: a mitigator against irradiation-injury to salivary glands. *Scientific Reports*. 2015;5:16017. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep16017>
69. Hladkykh FV, Koshurba IV, Chyzh MO. Characteristics of antiulcerogenic activity of placenta cryoextract in acute and chronic gastric lesions. *Modern Medical Technologies*. 2023;1(56):62–8. (in Ukrainian). DOI: [https://doi.org/10.34287/MMT.1\(56\).2023.10](https://doi.org/10.34287/MMT.1(56).2023.10)
70. Koshurba IV, Hladkykh FV, Chyzh MO. Modulation of lipid peroxidation and energy metabolism in the gastric mucosa as a mechanism of placenta cryoextract activity in the healing of stress-induced erosive-ulcerative lesions. *Gastroenterologiya*. 2022;56(3):149–55. (in Ukrainian). DOI: <https://doi.org/10.22141/2308-2097.56.3.2022.503>

71. Чиж М.О., Кошурба І.В., Марченко М.М., Гладких Ф.В., Белочкіна І.В. Гендерний детермінізм впливу кріоекстракту плаценти на гепатотропні ефекти езомепразолу, кларитроміцину та метронідазолу при хронічному ураженні печінки. *Сучасні медичні технології*. 2023. № 1 (56). С. 55–61. DOI: [https://doi.org/10.34287/MMT.1\(56\).2023.9](https://doi.org/10.34287/MMT.1(56).2023.9)
72. Na Y.K., Ban J.J., Lee M., Im W., Kim M. Wound healing potential of adipose tissue stem cell extract. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017. Vol. 485, № 1. P. 30–34. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.103>
73. Angeli F.S., Zhang Y., Sievers R., Jun K., Yim S., Boyle A., et al. Injection of human bone marrow and mononuclear cell extract into infarcted mouse hearts results in functional improvement. *Open Cardiovascular Medicine Journal*. 2012. Vol. 6. P. 38–43. DOI: <https://doi.org/10.2174/1874192401206010038>
74. Ryu J.H., Kim Y., Kim M.J., Park J., Kim J.W., Park H.S., et al. Membrane-free stem cell extract enhances blood-brain barrier integrity by suppressing NF-κB-mediated activation of NLRP3 inflammasome in mice with ischemic stroke. *Life (Basel)*. 2022. Vol. 12, № 4. P. 503. DOI: <https://doi.org/10.3390/life12040503>
75. Suleiman S., Di Fiore R., Cassar A., Formosa M.M., Schembri-Wismayer P., Calleja-Agius J. Axolotl *Ambystoma mexicanum* extract induces cell cycle arrest and differentiation in human acute myeloid leukemia HL-60 cells. *Tumour Biology*. 2020. Vol. 42, № 9. P. 1010428320954735. DOI: <https://doi.org/10.1177/1010428320954735>
76. Nishikawa T., Maeda K., Nakamura M., Yamamura T., Sawada T., Mizutani Y., et al. Filtrated adipose tissue-derived mesenchymal stem cell lysate ameliorates experimental acute colitis in mice. *Digestive Diseases and Sciences*. 2021. Vol. 66, № 4. P. 1034–1044. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06359-3>
77. Michel G., Blery P., Henoux M., Guicheux J., Weiss P., Dugast E., et al. Bone marrow cell extract promotes the regeneration of irradiated bone. *PLoS One*. 2017. Vol. 12, № 5. P. e0178060. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178060>
78. Choi J.M., Park H.S., He M.T., Kim Y.S., Kim H.Y., Lee A.Y., et al. Membrane-free stem cells and pyridoxal 5'-phosphate synergistically enhance cognitive function in Alzheimer's disease mouse model. *Antioxidants (Basel)*. 2022. Vol. 11, № 3. P. 601. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox11030601>
79. Lee C.W., Hsiao W.T., Lee O.K. Mesenchymal stromal cell-based therapies reduce obesity and metabolic syndromes induced by a high-fat diet. *Translational Research*. 2017. Vol. 182. P. 61–74.e8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.11.003>
80. Wang P., Cui Y., Wang J., Liu D., Tian Y., Liu K., et al. Mesenchymal stem cells protect against acetaminophen hepatotoxicity by secreting regenerative cytokine hepatocyte growth factor. *Stem Cell Research & Therapy*. 2022. Vol. 13, № 1. P. 94. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02754-x>
81. Tran S.D., Liu Y., Xia D., Maria O.M., Khalili S., Wang R.W., et al. Paracrine effects of bone marrow soup restore organ function, regeneration, and repair in salivary glands damaged by irradiation. *PLoS One*. 2013. Vol. 8, № 4. P. e61632. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061632>
82. Abughanam G., Elkashty O.A., Liu Y., Bakkar M.O., Tran S.D. Mesenchymal stem cells extract-based therapy alleviates xerostomia and keratoconjunctivitis sicca in Sjögren's syndrome-like disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20, № 19. P. 4750. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20194750>
83. Fang D., Su X., Liu Y., Lee J.C., Seuntjens J., Tran S.D. Cell extracts from spleen and adipose tissues restore function to irradiation-injured salivary glands. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2018. Vol. 12, № 2. P. e1289–e1296. DOI: <https://doi.org/10.1002/term.2567>
84. Taranger C.K., Noer A., Sørensen A.L., Håkelién A.M., Boquest A.C., Collas P. Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Molecular Biology of the Cell*. 2005. Vol. 16, № 12. P. 5719–5735. DOI: <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-06-0572>
85. Su X., Liu Y., Bakkar M., ElKashty O., El-Hakim M., Seuntjens J., Tran S.D. Labial stem cell extract mitigates injury to irradiated salivary glands. *Journal of Dental Research*. 2020. Vol. 99, № 3. P. 293–301. DOI: <https://doi.org/10.1177/0022034519898138>
86. Phosri S., Jangpromma N., Chang L.C., Tan G.T., Wongwattananukit S., Maijaroen S., et al. Siamese crocodile white blood cell extract inhibits cell proliferation and promotes autophagy in multiple cancer cell lines. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2018. Vol. 28, № 6. P. 1007–1021. DOI: <https://doi.org/10.4014/jmb.1712.12002>
87. Argyropoulou A., Aligiannis N., Trougakos I.P., Skaltsounis A.L. Natural compounds with anti-ageing activity. *Natural Product Reports*. 2013. Vol. 30, № 11. P. 1412–1437. DOI: <https://doi.org/10.1039/c3np70031c>
88. Zhao F., Wang Z., Huang H. Physical cell disruption technologies for intracellular compound extraction from microorganisms. *Processes*. 2024. Vol. 12. P. 2059. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr12102059>
71. Chyzh MO, Koshurba IV, Marchenko MM, Hladkykh FV, Belochkina IV. Gender determinism of the influence of placenta cryoextract on the hepatotropic effects of esomeprazole, clarithromycin, and metronidazole in chronic liver injury. *Modern Medical Technologies*. 2023;1(56):55–61. (in Ukrainian). DOI: [https://doi.org/10.34287/MMT.1\(56\).2023.9](https://doi.org/10.34287/MMT.1(56).2023.9)
72. Na YK, Ban JJ, Lee M, Im W, Kim M. Wound healing potential of adipose tissue stem cell extract. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017;485(1):30–4. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.103>
73. Angeli FS, Zhang Y, Sievers R, Jun K, Yim S, Boyle A, et al. Injection of human bone marrow and mononuclear cell extract into infarcted mouse hearts results in functional improvement. *Open Cardiovascular Medicine Journal*. 2012;6:38–43. DOI: <https://doi.org/10.2174/1874192401206010038>
74. Ryu JH, Kim Y, Kim MJ, Park J, Kim JW, Park HS, et al. Membrane-free stem cell extract enhances blood-brain barrier integrity by suppressing NF-κB-mediated activation of NLRP3 inflammasome in mice with ischemic stroke. *Life (Basel)*. 2022;12(4):503. DOI: <https://doi.org/10.3390/life12040503>
75. Suleiman S, Di Fiore R, Cassar A, Formosa MM, Schembri-Wismayer P, Calleja-Agius J. Axolotl *Ambystoma mexicanum* extract induces cell cycle arrest and differentiation in human acute myeloid leukemia HL-60 cells. *Tumour Biology*. 2020;42(9):1010428320954735. DOI: <https://doi.org/10.1177/1010428320954735>
76. Nishikawa T, Maeda K, Nakamura M, Yamamura T, Sawada T, Mizutani Y, et al. Filtrated adipose tissue-derived mesenchymal stem cell lysate ameliorates experimental acute colitis in mice. *Digestive Diseases and Sciences*. 2021;66(4):1034–44. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06359-3>
77. Michel G, Blery P, Henoux M, Guicheux J, Weiss P, Dugast E, et al. Bone marrow cell extract promotes the regeneration of irradiated bone. *PLoS One*. 2017;12(5):e0178060. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178060>
78. Choi JM, Park HS, He MT, Kim YS, Kim HY, Lee AY, et al. Membrane-free stem cells and pyridoxal 5'-phosphate synergistically enhance cognitive function in Alzheimer's disease mouse model. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(3):601. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox11030601>
79. Lee CW, Hsiao WT, Lee OK. Mesenchymal stromal cell-based therapies reduce obesity and metabolic syndromes induced by a high-fat diet. *Translational Research*. 2017;182:61–74.e8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.11.003>
80. Wang P, Cui Y, Wang J, Liu D, Tian Y, Liu K, et al. Mesenchymal stem cells protect against acetaminophen hepatotoxicity by secreting regenerative cytokine hepatocyte growth factor. *Stem Cell Research & Therapy*. 2022;13(1):94. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.11.003>
81. Tran SD, Liu Y, Xia D, Maria OM, Khalili S, Wang RW, et al. Paracrine effects of bone marrow soup restore organ function, regeneration, and repair in salivary glands damaged by irradiation. *PLoS One*. 2013;8(4):e61632. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061632>
82. Abughanam G, Elkashty OA, Liu Y, Bakkar MO, Tran SD. Mesenchymal stem cells extract-based therapy alleviates xerostomia and keratoconjunctivitis sicca in Sjögren's syndrome-like disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(19):4750. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20194750>
83. Fang D, Su X, Liu Y, Lee Jc, Seuntjens J, Tran SD. Cell extracts from spleen and adipose tissues restore function to irradiation-injured salivary glands. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2018;12(2):e1289–96. DOI: <https://doi.org/10.1002/term.2567>
84. Taranger CK, Noer A, Sørensen AL, Håkelién AM, Boquest AC, Collas P. Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Molecular Biology of the Cell*. 2005;16(12):5719–35. DOI: <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-06-0572>
85. Su X, Liu Y, Bakkar M, ElKashty O, El-Hakim M, Seuntjens J, Tran SD. Labial stem cell extract mitigates injury to irradiated salivary glands. *Journal of Dental Research*. 2020;99(3):293–301. DOI: <https://doi.org/10.1177/0022034519898138>
86. Phosri S, Jangpromma N, Chang LC, Tan GT, Wongwattananukit S, Maijaroen S, et al. Siamese crocodile white blood cell extract inhibits cell proliferation and promotes autophagy in multiple cancer cell lines. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2018;28(6):1007–21. DOI: <https://doi.org/10.4014/jmb.1712.12002>
87. Argyropoulou A, Aligiannis N, Trougakos IP, Skaltsounis AL. Natural compounds with anti-ageing activity. *Natural Product Reports*. 2013;30(11):1412–37. DOI: <https://doi.org/10.1039/c3np70031c>
88. Zhao F, Wang Z, Huang H. Physical cell disruption technologies for intracellular compound extraction from microorganisms. *Processes*. 2024;12:2059. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr12102059>

89. Khalid S., Chaudhary K., Amin S., Raana S., Zahid M., Naeem M., et al. Recent advances in the implementation of ultrasound technology for the extraction of essential oils from terrestrial plant materials: a comprehensive review. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2024. Vol. 107. P. 106914. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2024.106914>
90. Demesa A.G., Saavala S., Pöysä M., Koironen T. Overview and toxicity assessment of ultrasound-assisted extraction of natural ingredients from plants. *Foods*. 2024. Vol. 13, № 19. P. 3066. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods13193066>
91. Rahman M.M., Hosano N., Hosano H. Recovering microalgal bioresources: a review of cell disruption methods and extraction technologies. *Molecules*. 2022. Vol. 27, № 9. P. 2786. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27092786>
92. Liu H., Zeng F., Wang Q., Ou S., Tan L., Gu F. The effect of cryogenic grinding and hammer milling on the flavour quality of ground pepper (*Piper nigrum* L.). *Food Chemistry*. 2013. Vol. 141, № 4. P. 3402–3408. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.052>
93. White L.J., Taylor A.J., Faulk D.M., Keane T.J., Saldin L.T., Reing J.E., et al. The impact of detergents on the tissue decellularization process: a ToF-SIMS study. *Acta Biomaterialia*. 2017. Vol. 50. P. 207–219. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.12.033>
94. Ghorbani F., Ekhtari M., Moeini Chaghervand B., Moradi L., Mohammadi B., Kajbafzadeh A.M. Detection of the residual concentration of sodium dodecyl sulfate in the decellularized whole rabbit kidney extracellular matrix. *Cell and Tissue Banking*. 2022. Vol.23,№1.P.119–128.DOI:<https://doi.org/10.1007/s10561-021-09921-z>
89. Khalid S., Chaudhary K., Amin S., Raana S., Zahid M., Naeem M., et al. Recent advances in the implementation of ultrasound technology for the extraction of essential oils from terrestrial plant materials: a comprehensive review. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2024;107:106914. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2024.106914>
90. Demesa AG, Saavala S, Pöysä M, Koironen T. Overview and toxicity assessment of ultrasound-assisted extraction of natural ingredients from plants. *Foods*. 2024;13(19):3066. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods13193066>
91. Rahman MM, Hosano N, Hosano H. Recovering microalgal bioresources: a review of cell disruption methods and extraction technologies. *Molecules*. 2022;27(9):2786. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27092786>
92. Liu H, Zeng F, Wang Q, Ou S, Tan L, Gu F. The effect of cryogenic grinding and hammer milling on the flavour quality of ground pepper (*Piper nigrum* L.). *Food Chemistry*. 2013;141(4):3402–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.052>
93. White LJ, Taylor AJ, Faulk DM, Keane TJ, Saldin LT, Reing JE, et al. The impact of detergents on the tissue decellularization process: a ToF-SIMS study. *Acta Biomaterialia*. 2017;50:207–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.12.033>
94. Ghorbani F, Ekhtari M, Moeini Chaghervand B, Moradi L, Mohammadi B, Kajbafzadeh AM. Detection of the residual concentration of sodium dodecyl sulfate in the decellularized whole rabbit kidney extracellular matrix. *Cell and Tissue Banking*. 2022;23(1):119–28. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10561-021-09921-z>

Обмеження дослідження

Автори рукопису свідомо засвідчують, що обмеження цього огляду зумовлені як попередньо окресленими рамками тематики, часових періодів і типів досліджень, так і доступністю джерел. Пошукова стратегія охоплювала PubMed, Clinical Key Elsevier, Cochrane Library, eBook Business Collection та Google Scholar із визначеними датами індексації. Включені роботи відрізнялися за дизайном і методологічною якістю; у частині досліджень ризик упередженості був підвищеним, а міждослідницька варіабельність показників залишалася істотною, що знижує внутрішню валідність сукупних оцінок і обмежує узагальнюваність висновків на інші популяції та клінічні контексти. Для зменшення зазначених впливів застосовано незалежний подвійний відбір та вилучення даних, розширені комбінації ключових слів і логічних операторів.

Перспективи подальших досліджень

Подальші дослідження мають бути спрямовані на уточнення молекулярних механізмів криогенного ушкодження мембран та їхнього впливу на вивільнення регуляторних молекул. Потребує розвитку стандартизація протоколів криогенного лізису й отримання криоекстрактів із прогнозованим складом та стабільною біоактивністю. Важливим є порівняння різних технологій лізису щодо збереження пептидів і ліпідних сигнальних молекул, а також оптимізація параметрів заморожування. Перспективним напрямком залишається створення методів контролю якості та оцінка терапевтичної ефективності безклітинних криоконсервованих продуктів на моделях тканинної репарації.

Конфлікт інтересів

Всі автори подали до редакції заповнену Єдину форму розкриття конфлікту інтересів Міжнародного комітету редакторів медичних журналів «ICMJE» (*International Committee of Medical Journal Editors*). Автори рукопису свідомо засвідчують відсутність фактичного або потенційного конфлікту інтересів щодо результатів цієї роботи з фармацевтичними компаніями, виробниками біомедичних пристроїв, іншими організаціями, чії продукти, послуги, фінансова підтримка можуть бути пов'язані з предметом наданих матеріалів або які спонсорували проведені дослідження.

Limitations of the study

The authors of the manuscript consciously acknowledge that the limitations of this review are determined both by the previously defined scope of topics, time periods, and types of studies, as well as by the availability of sources. The search strategy covered PubMed, Clinical Key Elsevier, the Cochrane Library, the eBook Business Collection, and Google Scholar with specified indexing dates. The included works varied in design and methodological quality; in some studies, the risk of bias was elevated, and substantial inter-study variability of indicators persisted, which reduces the internal validity of the aggregated assessments and limits the generalizability of the conclusions to other populations and clinical contexts. To mitigate these influences, independent double screening and data extraction were applied, along with expanded combinations of keywords and logical operators.

Prospects for further research

Further studies should be directed toward clarifying the molecular mechanisms of cryogenic membrane damage and their impact on the release of regulatory molecules. The standardization of cryogenic lysis protocols and the production of cryoextracts with predictable composition and stable bioactivity requires further development. It is important to compare different lysis technologies regarding the preservation of peptides and lipid signaling molecules, as well as to optimize freezing parameters. A promising direction remains the development of quality-control methods and the evaluation of the therapeutic efficacy of cell-free cryopreserved products in tissue-repair models.

Conflict of interest

All authors have submitted to the editorial office a completed ICMJE Uniform Disclosure Form for Potential Conflicts of Interest (International Committee of Medical Journal Editors). The authors of the manuscript explicitly declare the absence of any actual or potential conflict of interest related to the results of this work with pharmaceutical companies, manufacturers of biomedical devices, or other organizations whose products, services, or financial support may be associated with the subject of the provided materials or that may have sponsored the conducted research.

Дотримання етичних норм

Автори рукопису свідомо засвідчують, що підготовка рукопису здійснювалась виключно на основі відкрито опублікованих наукових джерел. У роботі не використовувались персоналізовані дані пацієнтів, результати первинних клінічних або доклінічних досліджень. У зв'язку з цим отримання схвалення комісії з питань біоетики не вимагалось. Дослідження виконане з дотриманням принципів належної наукової практики та відповідно до міжнародних етичних стандартів, зокрема рекомендацій Комітету з публікаційної етики «COPE» (*Committee on Publication Ethics*).

Використання штучного інтелекту

Автори рукопису свідомо засвідчують, що у процесі проведення дослідження та підготовки цього рукопису не використовували жодних інструментів або сервісів генеративного штучного інтелекту для виконання будь-яких завдань, перелічених у Таксономії делегування завдань генеративному штучному інтелекту «GAIDeT» (*Generative Artificial Intelligence Delegation Taxonomy*, 2025 р.). Усі етапи роботи – від концептуалізації до фінального редагування – виконані без залучення генеративного штучного інтелекту, виключно авторами.

Первинні дані та матеріали

Автори рукопису свідомо засвідчують, що первинна медична документація (історії хвороби, амбулаторні картки, протоколи обстежень, результати лабораторних та інструментальних досліджень конкретних пацієнтів) та статистичні бази даних у роботі не використовувалися. Усі твердження та узагальнення підкріплені посиланнями на першоджерела, доступні у відкритому доступі або через наукові бібліотечні ресурси. Додаткові матеріали, що стосуються процесу відбору джерел чи деталізації методології аналізу, можуть бути надані автором-кореспондентом за обґрунтованим запитом.

Інформація про фінансування

Фінансування видатками Державного бюджету України. Стаття є фрагментом планової науково-дослідної роботи кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України «Вивчення ролі імунних, аутоімунних та метаболічних розладів у патогенезі та наслідках інфекційного процесу, що викликані бактеріями, вірусами, вірусно-бактеріальними асоціаціями при гострому, затяжному та хронічному перебігу хвороби та удосконалення тактики лікування», номер державної реєстрації 0123U105022, термін виконання: 2023–2028 рр., керівник – завідувачка кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології, кандидат медичних наук, доцент О.В. Волобуєва.

ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ

Студент Володимир Омелянович – аспірант кафедри загальної хірургії, анестезіології та паліативної медицини медичного факультету Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України; майдан Свободи, буд. 4, м. Харків, Україна, 61022; викладач Комунального закладу Львівської обласної ради «Львівський медичний фаховий коледж післядипломної освіти»; вул. Івана Миколайчука, буд. 9, м. Львів, Україна, 79059; медичний директор Товариства з обмеженою відповідальністю «Медичний центр 3D Діагностика», вул. Чернігівська, буд. 18, м. Львів, Україна, 79059;
e-mail: student.volodymyr@gmail.com
моб.: +38 (098) 080-00-68

Ethics statement

The authors of the manuscript explicitly confirm that the preparation of the manuscript was carried out solely on the basis of openly published scientific sources. No personalized patient data or results of primary clinical or preclinical studies were used in this work. Therefore, obtaining approval from a bioethics committee was not required. The study was conducted in accordance with the principles of good scientific practice and in line with international ethical standards, including the recommendations of the Committee on Publication Ethics (COPE).

Use of Generative Artificial Intelligence

The authors of the manuscript explicitly confirm that, during the course of the study and the preparation of this manuscript, they did not use any generative artificial intelligence tools or services for performing any tasks listed in the Generative Artificial Intelligence Delegation Taxonomy (GAIDeT, 2025). All stages of the work – from conceptualization to final editing – were carried out without the involvement of generative artificial intelligence and exclusively by the authors.

Data availability statement

The authors of the manuscript explicitly confirm that primary medical documentation (medical records, outpatient charts, examination protocols, and results of laboratory and instrumental tests of specific patients) and statistical databases were not used in this work. All statements and generalizations are supported by references to original sources available in open access or through scientific library resources. Additional materials related to the source selection process or the details of the analytical methodology may be provided by the corresponding author upon a justified request.

Funding information

Funded by the State Budget of Ukraine. The article is part of the planned research project of the Department of Infectious Diseases and Clinical Immunology of V.N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine: «Study of the role of immune, autoimmune, and metabolic disorders in the pathogenesis and consequences of infectious processes caused by bacteria, viruses, and viral-bacterial associations in the acute, prolonged, and chronic course of disease, and improvement of treatment strategies», state registration number 0123U105022, implementation period: 2023–2028; project supervisor – Head of the Department of Infectious Diseases and Clinical Immunology, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor O.V. Volobueva.

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Student Volodymyr Omelianovych – Postgraduate Student of the Department of General Surgery, Anesthesiology and Palliative Medicine of the School of Medicine of the V.N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine; 4 Svobody Sq., Kharkiv, Ukraine, 61022; Lecturer of the Municipal Institution of the Lviv Regional Council «Lviv Medical Applied College of Postgraduate Education»; 9 Ivana Mykolaychuka Str., Lviv, Ukraine, 79059; Medical Director of the Limited Liability Company «Medical 3D Diagnostics Centre»; 18 Chernihivska Str., Lviv, Ukraine, 79059;
e-mail: student.volodymyr@gmail.com
tel.: +38 (098) 080-00-68

Внесок автора: концепція роботи, формування структури огляду, відбір тематичних джерел, формування основних розділів огляду, первинне написання та літературне редагування тексту.

Author's contribution: development of the concept of the review, formulation of its structure, selection of thematic literature sources, preparation of the main sections of the manuscript, primary drafting and literary editing of the text.

Дробнер Ігор Гаррієвич – аспірант кафедри загальної хірургії, анестезіології та паліативної медицини медичного факультету Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України; майдан Свободи, буд. 4, м. Харків, Україна, 61022; завідувач відділення новоутворень грудної залози, шкіри, м'яких тканин і кісток Комунального некомерційного підприємства «Хмельницький протипухлинний центр» Хмельницької обласної ради, вул. Пілотська, буд. 1, м. Хмельницький, Україна, 29000;
e-mail: drobneri@gmail.com
mob.: +38 (050) 522-00-30

Drobner Ihor Harriievych – Postgraduate Student of the Department of General Surgery, Anesthesiology and Palliative Medicine of the School of Medicine of the V.N. Karazin National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine; 4 Svobody Sq., Kharkiv, Ukraine, 61022; Head of the Department of Breast, Skin, Soft Tissue, and Bone Neoplasms of the Communal Non-Commercial Enterprise «Khmelnitskyi Regional Antitumor Center» of the Khmelnytskyi Regional Council; 1 Pilot Str., Khmelnytskyi, Ukraine, 29000;
e-mail: drobneri@gmail.com
tel.: +38 (050) 522-00-30

Внесок автора: формування наукової концепції, уточнення формулювання мети, розробка критеріїв відбору літератури, аналіз даних щодо механічних та фізичних методів лізису, участь у підготовці висновків.

Author's contribution: refinement of the scientific concept, clarification of the aim of the review, development of literature selection criteria, analysis of data on mechanical and physical methods of cell lysis, contribution to the preparation of the conclusions.

Гладких Федір Володимирович – доктор філософії в галузі охорони здоров'я за спеціальністю «Медицина», доцент кафедри загальної хірургії, анестезіології та паліативної медицини медичного факультету Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України; майдан Свободи, буд. 4, м. Харків, Україна, 61022; старший науковий співробітник відділу променевої патології та паліативної медицини Державної установи «Інститут медичної радіології та онкології імені С. П. Григор'єва Національної академії медичних наук України», вул. Григорія Сковороди, буд. 82, м. Харків, Україна, 61024;
e-mail: fedir.hladkykh@gmail.com
mob.: +38 (099) 782-78-72

Hladkykh Fedir Volodymyrovych – Doctor of Philosophy in Health Care in specialty «Medicine», Associate Professor of the Department of General Surgery, Anesthesiology and Palliative Medicine of the School of Medicine of the V.N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine; 4 Svobody Sq., Kharkiv, Ukraine, 61022; Senior Research fellow Department of Radiation Pathology and Palliative Medicine of the State Organization «Grigoriev Institute for Medical Radiology and Oncology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine»; 82 Hryhoriia Skovorody Str., Kharkiv, Ukraine, 61024;
e-mail: fedir.hladkykh@gmail.com
tel.: +38 (099) 782-78-72

Внесок автора: наукове керівництво роботою, критичний аналіз джерел, опрацювання матеріалів щодо криогенного ушкодження мембран і механізмів льодоутворення, редагування тексту, формування остаточних висновків.

Author's contribution: scientific supervision of the work, critical appraisal of sources, analysis of literature on cryogenic membrane injury and ice-formation mechanisms, substantive editing of the manuscript, formulation of the final conclusions.

Лядов Данііл Артемович – аспірант кафедри молекулярної та медичної біофізики факультету радіофізики, біомедичної електроніки та комп'ютерних систем Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України; майдан Свободи, буд. 4, м. Харків, Україна, 61022;
e-mail: daniil.liadov.work@gmail.com
mob.: +38 (050) 555-24-48

Liadov Daniil Artemovych – Postgraduate Student of the Department of Molecular and Medical Biophysics Faculty of Radiophysics, Biomedical Electronics and Computer Systems of the V.N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine, 4 Svobody Sq., Kharkiv, Ukraine, 61022;
e-mail: daniil.liadov.work@gmail.com
tel.: +38 (050) 555-24-48

Внесок автора: підбір і аналітичне опрацювання джерел з біофізичних аспектів лізису та криошкодження, формування розділу щодо фізичних методів лізису, технічне редагування рукопису.

Author's contribution: selection and analytical evaluation of literature on biophysical aspects of cell lysis and cryogenic damage, preparation of sections related to physical methods of cell disruption, technical editing of the manuscript.

Волобуєв Данііл Олексійович – аспірант кафедри молекулярної та медичної біофізики факультету радіофізики, біомедичної електроніки та комп'ютерних систем Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України; майдан Свободи, буд. 4, м. Харків, Україна, 61022;
e-mail: danalex999@ukr.net
mob.: +38 (099) 259-82-83

Volobuev Daniil Oleksiirovych – Postgraduate Student of the Department of Molecular and Medical Biophysics, School of Radio Physics, Biomedical Electronics and Computer Systems of the V.N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine; 4 Svobody Sq., Kharkiv, Ukraine, 61022;
e-mail: danalex999@ukr.net
tel.: +38 (099) 259-82-83

Внесок автора: пошук і опрацювання літератури, аналіз хімічних і ферментативних методів лізису, участь у написанні оглядових розділів, підготовка таблиць/схем, внесення редакційних правок.

Author's contribution: literature search and analysis, evaluation of chemical and enzymatic methods of cell lysis, drafting of relevant review sections, preparation of tables and schemes, contribution to editorial revisions.

Рукопис надійшов
Manuscript was received
22.09.2025

Отримано після рецензування
Received after review
25.11.2025

Прийнято до друку
Accepted for printing
18.02.2026

Опубліковано
Published
27.02.2026