

**Дослідження морфофункціональної збереженості тромбоцитів на етапах кріоконсервування**

UDC 547.42:612.111.7

А.М. КОМПАНИЄЦЬ<sup>1\*</sup>, О.В. КНЫШ<sup>1</sup>, Т.М. ГУРИНА<sup>1</sup>,  
О.А. БОГДАНЧИКОВА<sup>1</sup>, С.Є. ОВСЯННИКОВ<sup>1</sup>, М.Л. ПОГРЕБНЯК<sup>2</sup>  
**Study of Morphofunctional Integrity of Platelets  
at Cryopreservation Stages**

Вивчено вплив кріопротекторів диметилсульфоксиду (ДМСО), диметилацетаміду (ДМАЦ), 1,2-пропандіолу (1,2-ПД), їх комбінацій і двох програм заморожування на морфофункціональні властивості тромбоцитів донорської крові людини на етапах кріоконсервування. Показано, що найвищі показники збереженості тромбоцитів отримані при їх кріоконсервуванні з ДМСО та комбінацією кріопротекторів 1,2-ПД і ДМАЦ у кінцевій концентрації 0,7 М при заморожуванні за програмою зі зняттям переохолодження. Отримані результати свідчать про необхідність розробки багатокомпонентних кріозахисних середовищ для кріоконсервування тромбоцитів і перспективність дослідження спеціальних програм заморожування з контрольованою швидкістю проходження температурного інтервалу кристалізації.

**Ключові слова:** тромбоцити, кріоконсервування, кріопротектори.

Исследовано влияние кріопротекторов диметилсульфоксида (ДМСО), диметилацетаміда (ДМАЦ), 1,2-пропандіола (1,2-ПД), их комбінацій и двух программ замораживания на морфофункціональные свойства тромбоцитов донорской крови человека на этапах кріоконсервирования. Показано, что наиболее высокие показатели сохранности тромбоцитов получены при их кріоконсервировании с ДМСО и комбинацией кріопротекторов 1,2-ПД и ДМАЦ в конечной концентрации 0,7 М при замораживании по программе со снятием переохладения. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости разработки многокомпонентных кріозащитных сред для кріоконсервирования тромбоцитов и перспективности исследования специальных программ замораживания с контролируемой скоростью прохождения температурного интервала кристаллизации.

**Ключевые слова:** тромбоциты, кріоконсервирование, кріопротекторы.

There were studied the effects of dimethyl sulfoxide (DMSO), dimethyl acetamide (DMAC), 1,2-propane diol (1,2-PD), their combination and two freezing programs on morphofunctional properties of human donor blood platelets at cryopreservation stages. The highest indices of platelet integrity were shown to be obtained at their cryopreservation with DMSO and when combining 1,2-PD with DMAC in 0.7 M final concentration during freezing according to the program with overcooling elimination. The results obtained testify to the necessity in elaborating the polycomponent cryoprotective media for platelet cryopreservation and perspectiveness in investigating special freezing programs with a controlled rate of passing through temperature interval of crystallisation.

**Key-words:** platelets, cryopreservation, cryoprotectants.

У дослідженнях з кріоконсервування концентратів тромбоцитів (КТ) для клінічної практики актуальною задачею є вибір ефективного і нетоксичного кріопротектора (КП). Аналіз літератури показав, що найбільш перспективними КП при заморожуванні КТ є диметилсульфоксид (ДМСО), диметилацетамід (ДМАЦ) та 1,2-пропандіол (1,2-ПД). ДМСО визнано “золотим стандартом”, оскільки він забезпечує найвищий рівень збереженості тромбоцитів під час кріоконсервування [18]. Але повна заборона використання ДМСО як фармакологічного агента внаслідок відомої токсичної дії потребує його повного видалення із клітинної суспензії перед трансфузією, яке супрово-

Selecting an efficient and non-toxic cryoprotectant (CP) is a current task in research on platelet concentrates (PC) cryopreservation for clinical practice. Literature analysis has demonstrated dimethyl sulfoxide (DMSO), dimethyl acetamide (DMAC) and 1,2-propanediol (1,2-PD) as the most perspective cryoprotectants for PC freezing. DMSO was recognised as the “gold standard” because of providing the highest level of platelet integrity during cryopreservation [18]. But an absolute prohibition of DMSO application as a pharmacological agent due to the known toxic effect requires its complete removal out of cell suspension prior to transfusion, accompanying with additional losses and damages in cryopreserved platelets, redu-

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

<sup>2</sup>Інститут синтіляційних матеріалів НТК “Інститут монокристалів” НАН України, м. Харків

\* Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію: вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015; тел.: +38 (057) 373-30-07, факс: +38 (057) 373-30-84, електронна пошта: cryo@online.kharkov.ua

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

<sup>2</sup>Institute of Scintillation Materials of State Science and Technology Concern ‘Institute of Solid Crystals’ of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3007, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

джується додатковими втратами і пошкодженням кріоконсервованих тромбоцитів, знижує їх життєздатність і лікувальну ефективність [16]. ДМАЦ менш токсичний, але його кріопротекторні властивості вважаються нижчими, ніж ДМСО [2, 5]. Стосовно 1,2-ПД слід враховувати достатньо високу його ефективність при кріоконсервуванні багатьох біологічних об'єктів та низьку токсичність. Результати досліджень [6] свідчать про перспективність 1,2-ПД при заморожуванні кров'яних пластинок, але за даними інших авторів ця кріозахисна сполука має слабку кріозахисну дію по відношенню до тромбоцитів [14].

Мета роботи – порівняльне дослідження впливу кріопротекторів на морфофункціональні властивості тромбоцитів; оцінка ефективності кріоконсервування КТ з обраними кріопротекторами та при їх комбінації.

### Матеріали та методи

Концентрати тромбоцитів одержували з окремих доз донорської крові, яку заготовляли на консерванті “Глюгіцир”, методом диференційованого центрифугування з використанням рефрижераторної центрифуги та пластикових мішків “Гемакон” і “Компопласт” [1]. До заморожування КТ зберігали при  $22\pm 2^\circ\text{C}$  протягом 18-24 год при постійному перемішуванні на автоматичній мішалці зі швидкістю 2 об/хв.

У роботі використовували ДМСО, 1,2-ПД та ДМАЦ, які були очищені та ідентифіковані у ІПКіК НАН України.

Агрегаційну здатність тромбоцитів визначали фотометричним методом [14] за допомогою аналізатора “Colysagraph” (США) з графічною реєстрацією змін оптичної густини суспензії на самописці “Endim 622.01” (Німеччина). Одержані показники у присутності розчинів КП 0,1 М виражали у відсотках до показників агрегації зразка, у який замість розчину КП вводили плазму – контроль А. Після експозиції КТ з розчинами КП 0,7 і 1,4 М протягом 15 і 30 хв при  $22\pm 2^\circ\text{C}$  та наступного видалення КП способом [12] результати виражали у відсотках до контрольних показників зразків – контроль Б, які піддавали процедурі видалення КП паралельно з дослідними, але замість розчину КП вводили аутологічну плазму. Індукторами агрегації були розчини АДФ у кінцевій концентрації 200  $\mu\text{M}$  (“Serva”) та колаген у кінцевій концентрації 20 мг/мл (“Технологія-СТАНДАРТ”, Білорусь).

Реакцію на гіпотонічний шок (РГШ) реєстрували за допомогою аналізатора “Colysagraph” (США) методом [14] після експозиції КТ з розчинами КП та видалення останнього. Результати виражали у відсотках до показників РГШ контролю Б.

Морфологію тромбоцитів досліджували за допомогою інвертованого люмінесцентного мікро-

скапюючої їх життєздатності та терапевтичної ефективності [16]. ДМАЦ є менш токсичним, але його кріопротекторні властивості вважаються нижчими порівняно з ДМСО [2, 5]. Щодо 1,2-ПД слід врахувати його високу ефективність при кріоконсервуванні багатьох біологічних об'єктів та низьку токсичність. Результати досліджень [6] свідчать про перспективність 1,2-ПД для заморожування тромбоцитів, але за даними інших авторів ця кріопротекторна сполука має слабку кріопротекторну дію по відношенню до тромбоцитів [14].

Дослідження було спрямоване на порівняльну оцінку впливу кріопротекторів на морфофункціональні властивості тромбоцитів; оцінку ефективності кріоконсервування КТ з обраними кріопротекторами та при їх комбінації.

### Materials and methods

Platelet concentrates were procured from separate doses of donor blood, prepared on “Glycicir” preservative by the method of differentiated centrifugation using cold centrifuge, “Hemacon” and “Komoplast” plastic bags [1]. Prior to cryopreservation PC were stored at  $22\pm 2^\circ\text{C}$  within 18-24 hrs at a constant mixing by automatic stirrer with 2 rpm rate.

DMSO, 1,2-PD and DMAC, purified and identified at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine were used in the research.

Platelet ability to aggregate was determined using the photometrical method [14] by means of “Colysagraph” analyzer (USA) with a graphic recording of changes in suspension optical density with “Endim 622.01” recorder (Germany). The obtained indices at the presence of 0.1 M CP solutions were expressed in percentage to the aggregation indices of a sample, where a plasm was introduced instead of CP solution: control A. After PC exposure with 0.7 and 1.4 M CP solutions for 15 and 30 min at  $22\pm 2^\circ\text{C}$  and following CP removal as described in the paper [12], the results were expressed in percentage to the control indices of samples: control B, which underwent the procedure of CP removal together with the studied ones, but an autologous plasm was introduced instead of CP solution. ADP solutions in 200  $\mu\text{M}$  (“Serva”) and collagen in 220 mg/ml final concentrations (“Tekhnologiya-STANDARD”, Byelorussia) served as aggregation inducers.

Hypotonic shock response (HSR) was recorded with “Colysagraph” analyzer (USA) using the method, detailed in the paper [14] after PC exposure with CP solutions and removal of the latter. Results were expressed in percentage to the HSR indices of control B.

Platelet morphology was studied with inverted luminescent microscope “Olympus IX74” (Japan). Cytological preparations were prepared from platelets suspension after their vital staining with acridine orange (AO) using the method, described in the paper

скопа "Olympus IX74" (Японія). Цитологічні препарати готували із суспензії тромбоцитів після їх вітального забарвлення акридинним оранжевим (АО) за методом [3]. Збудження флуорохрому викликали світлом ксенонової лампи при довжині хвилі 450-490 нм, дослідження проводили при 500 нм з наступним збільшенням в бік червоної області спектра. При спостереженні та фотографуванні об'єктів дослідження використовували імерсійний об'єктив ( $\times 100$ ). Для кількісного аналізу морфологічного складу популяції тромбоцитів рахували кров'яні пластинки кожного виду: гранулярні (неактивовані, активовані), дегранульовані, акридин-негативні, мікроформи, агрегати.

При кріоконсервуванні застосовували КП у кінцевій концентрації 0,7 М та комбінацію ДМАЦ і 1,2-ПД з кінцевою концентрацією кожного 0,35 М (загальна 0,7 М) та 0,175 М (загальна 0,35 М). Розчини КП на плазмі вводили в КТ у співвідношенні 1:1 протягом 1 хв. Об'єм зразка становив 1,6 мл. Заморожування проводили одразу після введення розчину КП в КТ за допомогою програмного заморозувача "Cryoson" (Німеччина) у кріоампулах "Nunc" (Німеччина) за програмами 1 та 2, які мали різну швидкість проходження температурного інтервалу кристалізації кріозахищеного розчину. При заморожуванні за програмою 1 зразок охолоджували від  $22\pm 2^\circ\text{C}$  до  $-35\text{...}-40^\circ\text{C}$  зі швидкістю  $1^\circ\text{C}/\text{хв}$ , після чого занурювали у рідкий азот. Програму 2 виконували від  $22\pm 2^\circ\text{C}$  до температури кристалізації зі швидкістю  $1^\circ\text{C}/\text{хв}$ , при температурі кристалізації проводили температурну ініціацію, далі зразок охолоджували зі швидкістю  $1-2^\circ\text{C}/\text{хв}$  до  $-35\text{...}-40^\circ\text{C}$  та занурювали у рідкий азот [11]. Ця програма забезпечує зняття переохолодження у зразках при їх заморожуванні. Зразки відігрівали на водяній бані при  $37^\circ\text{C}$ , одразу оцінювали кількісну збереженість тромбоцитів за методом [9].

Після центрифугування розморожених зразків визначали ступінь пошкодження клітин за активністю у супернатанті цитозольних ферментів: лактат-дегідрогенази (ЛДГ) [7] та глюкозо-6-фосфат-дегідрогенази (Г6ФДГ) [8]. Контролем служили КТ з максимальним виходом ферментів, що одержали триразовим заморожуванням зразка без КП прямим зануренням у рідкий азот з наступним відігріванням при  $37^\circ\text{C}$  – термоциклювання (Т); збагачена тромбоцитами плазма (ЗТП) та КТ до заморожування. Морфофункціональну збереженість кріоконсервованих тромбоцитів оцінювали після видалення кріопротектора. Одержані показники виражали у відсотках до відповідних показників КТ до заморожування – контроль.

Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою програми Microsoft Excel.

[3]. Fluorochrome excitation was induced by the xenon lamp light at 450-490 nm wavelength, research was done from 500 nm at the following increase towards red region. For object monitoring and photography the immersion lens ( $\times 100$ ) were used. For a quantitative analysis of morphological composition of platelet population we calculated blood platelets of each type: granular (non-activated, activated), degranulated, acridine-negative, microforms, aggregates.

CP in 0.7 M final concentration and DMAC and 1,2-PD combination with final concentration of each 0.35 M (0.7 M total) and 0.175 M (0.35 M total) were used at cryopreservation. CP solutions on plasm were introduced into PC in 1:1 ratio for 1 min. Sample volume was 1.6 ml. Freezing was done right after introducing CP solution into PC using a programmable freezer "Cryoson" (Germany) into the "Nunc" cryovials (Germany) according to the programs 1 and 2 with different rate of passing through a temperature interval of crystallisation in cryoprotective solution. When freezing with the program 1 the sample was cooled from  $22\pm 2^\circ\text{C}$  down to  $-35\text{...}-40^\circ\text{C}$  with  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  rate and immersed then into liquid nitrogen. Program 2 was accomplished from  $22\pm 2^\circ\text{C}$  down to crystallisation temperature with  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  rate, a temperature initiation was done at crystallisation temperature, then the sample was cooled with  $1-2^\circ\text{C}/\text{min}$  rate down to  $-35\text{...}-40^\circ\text{C}$  and immersed into liquid nitrogen [11]. This program provides the elimination of overcooling in samples under their freezing. Samples were thawed at water bath at  $37^\circ\text{C}$  with simultaneous estimation of quantitative integrity of platelets by the method [9].

After centrifuging frozen-thawed samples a degree of cell damage was determined according to the activity in supernatant of cytosol enzymes: lactate dehydro-genase (LDG) [7] and glucose-6-phosphate dehydro-genase (G6PDG) [8]. The control was PC with the maximum release of enzymes, obtained by a three-fold freezing of the CP-free sample by a direct immersion into liquid nitrogen with following thawing at  $37^\circ\text{C}$ : thermocycling (T); platelet-rich plasm (PRP) and PC prior to freezing. Morphofunctional integrity of cryopreserved platelets was estimated after cryoprotectant removal. The obtained indices were expressed in percentage in respect of the corresponding PC indices before freezing: the control. The results obtained were statistically processed with Microsoft Excel.

## Results and discussion

An important condition to adequately estimate the integrity of platelet morphofunctional peculiarities under cryopreservation is a removal of cryoprotective solution out of platelet suspension, which is done by centrifuging, supernatant removal and resuspending of precipitated cells in CP-free plasm. The result of such CP removal is an additional damage of blood

## Результати та обговорення

Важливою умовою адекватної оцінки збереженості морфофункціональних властивостей тромбоцитів на етапах кріоконсервування є видалення кріозахисного розчину із суспензії кров'яних пластинок, яке здійснюють центрифугуванням, видаленням супернатанту і ресуспендуванням осаджених клітин у плазмі без КП. Результат такого видалення КП – додаткове пошкодження кров'яних пластинок [13, 17]. Деякі автори пропонують замінити центрифугування розведенням клітин аутологічною плазмою до одержання низьких кінцевих концентрацій КП. Так, автори роботи [19] не виявили достовірних відмінностей між показниками агрегації розведених тромбоцитів (кінцева концентрація ДМСО 0,7-1%) і тими, що відмивалися одноразово (кінцева концентрація ДМСО 0,05%).

Ми розробили і використали новий спосіб максимального видалення кріопротекторів із суспензії тромбоцитів, який не чинить пошкоджуючої дії [12]. Застосування цього способу дозволило отримати більш вірогідну інформацію стосовно впливу факторів кріоконсервування на морфофункціональний стан тромбоцитів. Присутність у суспензії клітин досліджуваних КП при концентрації 0,1 М (0,76-0,87%) має інгібуючий вплив на агрегацію тромбоцитів (таблиця). Найбільш виражене пригнічення даної функції спостерігається в присутності ДМАЦ. Достовірних відмінностей між ступенем пригнічення АДФ- і колаген-індукованої агрегації під впливом ДМСО та 1,2-ПД не виявлено. Показники АДФ і колаген-індукованої агрегації тромбоцитів після експозиції з ДМСО 0,7 та 1,4 М, а також після його видалення достовірно не відрізнялися від показників агрегації конт-

platelets [13, 17]. Some authors propose to change centrifugation for cell dilution with autologous plasma up to obtaining the low final CP concentration. Thus, the authors of paper [19] did not reveal any statistically significant differences between aggregation indices of diluted platelets (0.7-1% DMSO final concentration) and those, being once washed (0.05% DMSO final concentration).

We have developed and used a new way for maximum removal of cryoprotectant out of platelet suspension with no damaging effect [12]. This way application enabled to obtain more statistically significant information about the effect of cryopreservation factors on platelet morphofunctional state. The presence in cell suspension of studied CP in 0.1 M concentration (0.76-0.87%) has an inhibiting effect on platelet aggregation (Table). The most manifested suppression of this function is observed at DMAC presence. No statistically significant differences between the suppression degree of ADP- and collagen-induced aggregation under DMSO and 1,2-PD effect were revealed. Indices of ATP and collagen-induced aggregation of platelets after exposure with 0.7 and 1.4 M DMSO, as well as after its removal did not statistically and significantly differ from those of aggregation in control samples. The tendency to augmentation and a statistically significant increase in a degree of aggregative response to the introduction of inducers after exposure and removal of 0.7 and 1.4 M 1,2-PD was observed. Platelet exposure to 0.7 and 1.4 M DMAC solutions, as well as its removal resulted in a visible suppression of aggregative response, induced by agonists.

After cryopreservation the statistically significant highest level in preserving aggregation to ADP was provided by applying DMAC and its combination with

Вплив розчинів КП на агрегаційну здатність тромбоцитів  
CP solutions effect on aggregation ability of platelets

Вид КП CP	Агрегація на АДФ,% ADP aggregation,%			Агрегація на колагені,% Collagen aggregation,%		
	Присутність КП 0,1 М Presence of 0.1 M CP	Після експозиції та видалення КП After exposure to and removal of CP		Присутність КП 0,1 М Presence of 0.1 M CP	Після експозиції та видалення КП After exposure to and removal of CP	
		0,7 М 0.7 M	1,4 М 1.4 M		0,7 М 0.7 M	1,4 М 1.4 M
ДМСО DMSO	60,9±10,6*	89,2±10,6	82,8±9 #	65,3±10,6*	89,38±9,7	80,5±10,3*
1,2-ПД 1,2-PD	56,3±13,2*	105±14,5*	112±16,3 #	58,67±9,5*	107,7±12,8*	116±12,8**
ДМАЦ DMAC	12,9±10,3*	83±10,3*	74,8±9,9**	11,96±15,3*	79,3±11,2*	71,6±10**

**Примітки:** \* – відмінності статистично достовірні відносно показників контролю А, прийнятого за 100%, p<0,05;  
\*\* – відмінності статистично достовірні відносно показників контролю Б, прийнятого за 100%, p<0,05;  
# – тенденція до підвищення або зниження показників у порівнянні з контролем Б, p<0,1.

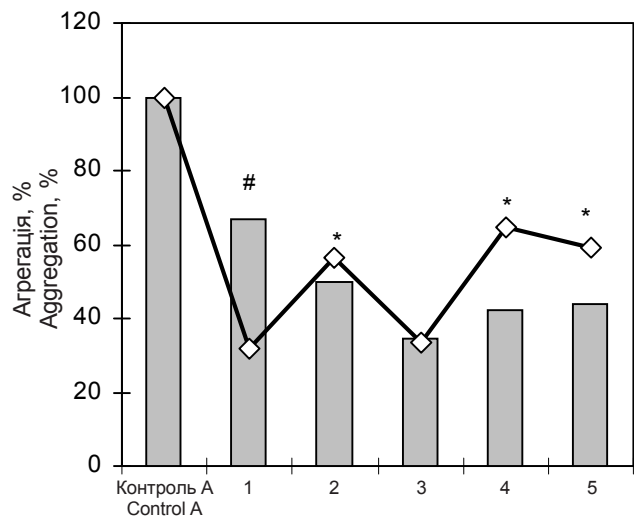
**Notes:** \* – differences are statistically significant in respect of the control indices A, assumed as 100%, p<0.05  
\*\* – differences are statistically significant in respect of the control indices B, assumed as 100%, p<0.05  
# – tendency to increase or decrease in indices in comparison with the control B, p<0.1.

рольних зразків. Спостерігалися тенденція до підвищення та достовірне підвищення ступеня агрегаційної відповіді на введення індукторів після експозиції та видалення 1,2-ПД 0,7 та 1,4 М. Результатом експозиції тромбоцитів з розчинами ДМАЦ 0,7 і 1,4 М, а також його видалення є помітне пригнічення агрегаційної відповіді, яка індукована агоністами.

Після криоконсервування достовірно найвищий рівень збереженості агрегації на АДФ забезпечили використання ДМАЦ та його комбінація з 1,2-ПД (рис.1). Результатом заморожування з ДМСО та 1,2-ПД був однаковий ступінь збереженості агрегації на АДФ. За ефективністю забезпечення збереженості колаген-індукованої агрегації тромбоцитів криопротектори та їх комбінації можна розташувати у порядку зростання: 1,2-ПД 0,7 М < (ПД+ДМАЦ) 0,7М < (ПД+ДМАЦ) 0,35 М < ДМАЦ 0,7 М < ДМСО 0,7 М. Достовірних відмінностей між агрегаційною здатністю тромбоцитів, заморожених за двома програмами, не виявлено, але спостерігається тенденція до підвищення збереженості вказаної функції при застосуванні програми 2.

Здатність тромбоцитів до компенсації після збільшення початкового об'єму у гіпотонічному середовищі (тобто РГШ) потребує структурно-функціональної цілісності і добре корелює з відновленням *in vivo* після трансфузії. В результаті проведених досліджень ми прийшли до висновку, що обрані криопротектори у концентрації 0,7 М не впливають на здатність кров'яних пластинок до відновлення об'єму у РГШ. При підвищенні концентрації криопротекторів у розчинах до 1,4 М спостерігається тенденція до зменшення показників РГШ, особливо для ДМАЦ.

Криоконсервування призводить до значного порушення осморегуляторних властивостей кров'яних пластинок. Найвищий рівень збереженості РГШ отримано при криоконсервуванні тромбоцитів з ДМСО та при комбінації ДМАЦ і 1,2-ПД із загальною кінцевою концентрацією 0,7 М (рис.2). При комбінації ДМАЦ з 1,2-ПД у кінцевій концентрації 0,35 М та 1,2-ПД у кінцевій концентрації 0,7 М результати криоконсервування за даним тестом виявилися вірогідно нижчими. За показниками попередніх досліджень встановлено, що більш високий рівень збереженості морфофункціональних властивостей тромбоцитів спостерігався при використанні менших концентрацій 1,2-ПД – 0,35 М [6]. Але в даній роботі ми приводимо результати використання однієї кінцевої концентрації криопротекторів – 0,7 М. Враховуючи те, що серед досліджуваних криопротекторів найбільша проникність по відношенню до мембрани тромбоцитів властива 1,2-ПД, останній



**Рис. 1.** Агрегаційна здатність тромбоцитів після криоконсервування за програмою 2: стовпчики – колаген-агрегація; лінія – АДФ-агрегація; 1 – ДМСО 0,7 М; 2 – ДМАЦ 0,7 М; 3 – 1,2-ПД 0,7 М; 4 – 1,2-ПД + ДМАЦ 0,7 М; 5 – 1,2-ПД + ДМАЦ 0,35 М. Відмінності статистично достовірні відносно показників після криоконсервування: \* – з ДМСО та 1,2-ПД,  $p < 0,05$ ; # – з 1,2-ПД, ДМАЦ та при їх комбінації,  $p < 0,05$ .

**Fig. 1.** Aggregative ability of platelets after cryopreservation according to the program 2: columns represent collagen-aggregation; line represents ADP-aggregation; 1 – 0.7 M DMSO; 2 – 0.7 M DMAC; 3 – 0.7 M 1,2-PD; 4 – 0.7 M 1,2-PD + DMAC; 5 – 0.35 M 1,2-PD+DMAC. Differences are statistically significant in respect of indices after cryopreservation: \* – using DMSO and 1,2-PD,  $p < 0.05$ ; # – using 1,2-PD, DMAC and at their combination,  $p < 0.05$ .

1,2-PD (Fig. 1). Freezing with DMSO and 1,2-PD resulted in an equal preservation extent of aggregation to ADP. By the efficiency of providing the preservation for collagen-induced platelet aggregation the cryoprotectants and their combinations can be placed in an increasing order: 0.7 M 1,2-PD < 0.7 M (PD + DMAC) < 0.35 M (PD + DMAC) < 0.7 M DMAC < 0.7 M DMSO. Any statistically significant differences between aggregative ability of platelets, frozen by two programs were not revealed, but the tendency to the augmentation in the mentioned function preservation when applying program 2 is observed.

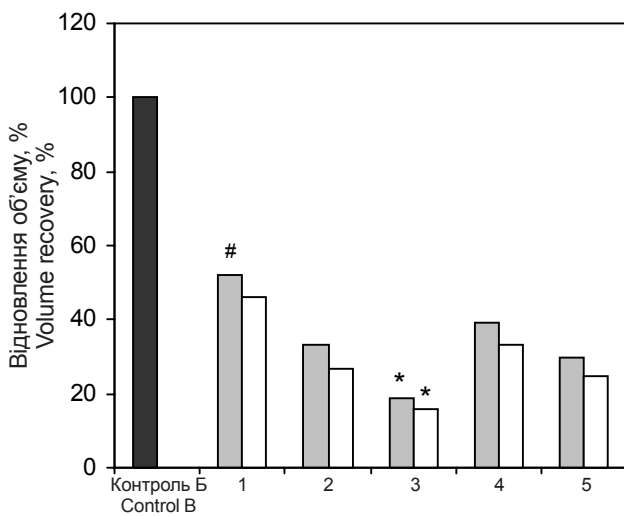
Platelet ability to compensation after increasing an initial volume in hypotonic medium (i.e. HSR) needs a structural and functional integrity and correlates well with *in vivo* recovery after transfusion. As a result of investigations performed we concluded that the selected cryoprotectants under 0.7 M concentration did not affect the platelet ability to volume recovery in HSR. With an increase in cryoprotectant concentration up to 1.4 M in solutions the tendency to a decrease in HSR indices, especially for DMAC is observed.

Cryopreservation results in a significant disorder in osmoregulative properties of blood platelets. The highest level of HSR integrity was obtained during

повинен мати найменш виражений осмотичний вплив на клітини. Можна зробити припущення, що більш низькі показники РГШ при заморожуванні з 1,2-ПД 0,7 М обумовлені його токсичністю за тих концентрацій, які досягаються в процесі заморожування. Високі показники відновлення тромбоцитів після кріоконсервування з комбінацією 1,2-ПД та ДМАЦ підтверджують правильність нашого припущення. Ми вважаємо, що застосування комбінації КП дозволило досягти підвищення збереженості тромбоцитів за рахунок зменшення токсичного впливу кожного з них при загальній концентрації 0,7 М у кріозахисному розчині.

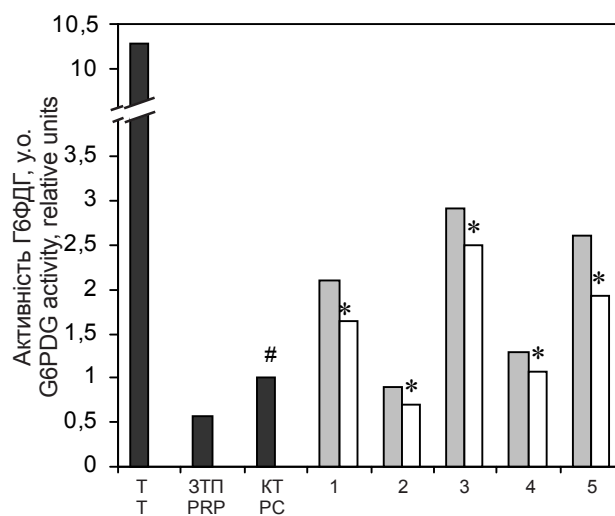
Вихід каталітичних білків в екзоцелюлярне середовище – показник порушення проникності плазматичних мембран та клітинних пошкоджень. Порівнюючи активність ЛДГ та Г6ФДГ, визначену в плазмі одразу після виділення КТ і перед кріоконсервуванням (рис. 3), вважаємо, що процеси виділення та зберігання КТ протягом 18-24 год супроводжуються помітним збільшенням пошкодженості клітин. Експозиція КТ з ДМСО та 1,2-ПД 0,7 М протягом 15 хв істотно не впливає на активність вищезазначених ферментів у плазмі, в

platelet cryopreservation with DMSO and at DMAC and 1,2-PD combination in 0.7 M final concentration (Fig. 2). When combining DMAC with 1,2-PD in 0.35 and 0.7 M final concentrations, correspondingly, the cryopreservation results according to this test occurred to be statistically and significantly lower. By the indices of previous research a higher level of integrity of platelet morphofunctional properties was established to be observed in applying lower concentrations of 1,2-PD: 0.35 M [6]. However in this work we demonstrate the results of applying one final concentration of cryoprotectants: 0.7 M. Taking into account the fact that among the studied cryoprotectants the highest penetration in respect of platelet membranes is inherent to 1,2-PD, the latter should have less manifested osmotic effect on cells. We can speculate that lower indices of HSR at freezing with 0.7 M 1,2-PD are stipulated by its toxicity in those concentrations, achieved during freezing. High indices of platelet recovery after cryopreservation with 1,2-PD and DMAC combination are confirmed by our correct supposition. We consider the application of CP combination as enabling to achieve the augmentation of platelet preservation due to a reduction of toxic effect



**Рис. 2.** Ступінь РГШ після кріоконсервування за програмами 1 (□), 2 (□): 1 – ДМСО 0,7 М; 2 – ДМАЦ 0,7 М; 3 – 1,2-ПД 0,7 М; 4 – 1,2-ПД + ДМАЦ 0,7 М; 5 – 1,2-ПД + ДМАЦ 0,35 М. Відмінності статистично достовірні відносно показників після кріоконсервування: \* – з ДМАЦ та 1,2-ПД та їх комбінації,  $p < 0,05$ ; # – з ДМСО, ДМАЦ та при комбінації ДМАЦ з 1,2-ПД,  $p < 0,05$ .

**Fig. 2.** HSR degree after cryopreservation according to the programs 1 (□), 2 (□): 1 – 0.7 M DMSO; 2 – 0.7 M DMAC; 3 – 0.7 M 1,2-PD; 4 – 0.7 M 1,2-PD + DMAC; 5 – 0.35 M 1,2-PD+DMAC. Differences are statistically significant in respect of indices after cryopreservation: \* – using DMAC, 1,2-PD and at their combination,  $p < 0.05$ ; # – using DMSO, DMAC and at DMAC and 1,2-PD combination,  $p < 0.05$ .



**Рис. 3.** Вплив кріоконсервування за програмами 1 (□), 2 (□) на рівень пошкодження тромбоцитів, визначений за активністю цитозольних ферментів у середовищі кріоконсервування: 1 – ДМСО 0,7 М; 2 – ДМАЦ 0,7 М; 3 – 1,2-ПД 0,7 М; 4 – 1,2-ПД + ДМАЦ 0,7 М; 5 – 1,2-ПД + ДМАЦ 0,35 М; \* – відмінності статистично достовірні відносно показників після кріоконсервування за програмою 1,  $p < 0,05$ ; \*\* – відмінності статистично достовірні відносно показників ЗТП,  $p < 0,05$ .

**Fig. 3.** Effect of cryopreservation according to the programs 1 (□) and 2 (□) at the level of platelet damage determined by the activity of cytosol enzymes in cryopreservation medium: 1 – 0.7 M DMSO; 2 – 0.7 M DMAC; 3 – 0.7 M 1,2-PD; 4 – 0.7 M 1,2-PD + DMAC; 5 – 0.35 M 1,2-PD + DMAC; \* – differences are statistically significant in respect of indices after cryopreservation by the program 1,  $p < 0.05$ ; # – differences are statistically significant in respect of PRP indices,  $p < 0.05$ .

той час як експозиція КТ з ДМАЦ призводить до суттєвого зменшення їх активності.

Підвищення активності цитозольних ферментів у криозахисному середовищі є ознакою їх виходу з клітин внаслідок кріопшкодження і може використовуватися в комплексній оцінці морфофункціональної збереженості клітин після кріоконсервування. Заморожування з усіма досліджуваними кріопротекторами та при їх комбінації призводить до вірогідно більшого зростання активності ферментів після кріоконсервування за програмою 1, ніж за програмою 2 (рис. 3). За даним тестом встановлено, що заморожування з ДМСО більш ефективне, ніж з 1,2-ПД. Рівень активності цитозольних ферментів після кріоконсервування з ДМАЦ та при його комбінації з 1,2-ПД у загальній кінцевій концентрації 0,7 М виявився найнижчим. При дослідженні впливу кріопротекторів безпосередньо на активність ЛДГ та Г6ФДГ ми виявили, що ДМАЦ її пригнічує. Враховуючи це, вважаємо некоректним порівняння результатів кріоконсервування КТ з ДМАЦ та результатів їх заморожування в присутності ДМСО та 1,2-ПД, оскільки вони не впливають на активність ферментів. Метод оцінки рівня пошкодження клітин за активністю у супернатанті цитозольних ферментів виявляється коректним у порівнянні ефективності програм заморожування при використанні одного кріопротектора в різних концентраціях або при порівнянні ефективності заморожування з різними КП, які не впливають на активність досліджуваних ферментів.

Характерний показник функціональної активності тромбоцитів – здатність до акумуляції органічних катіонів. Особливо перспективним для вивчення цієї здатності вважається застосування флуоресцентних похідних акридину, які можуть накопичуватися у гранулярному апараті тромбоцитів і виводитися разом з вмістом гранул у оточуюче середовище при секреції, під час реакції вивільнення у результаті активації або пошкодження кров'яних пластинок [3]. Встановлено, що здатність до накопичення АО достатньо стабільна і не змінюється протягом 3-х діб зберігання КТ при температурі  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , але при більш тривалому зберіганні КТ (до 9 діб) і зниженні температури суспензії до  $0-4^\circ\text{C}$  вона зменшується [4, 10]. Ми дослідили вплив процесів виділення і зберігання КТ, експозиції КТ з КП та заморожування, відігрівання, видалення КП на вказану властивість кров'яних пластинок.

В цитологічних препаратах, які одержані зі ЗТП (рис. 4), співвідношення морфологічних типів тромбоцитів таке, як у здорової людини [3]. Цитологічна картина препаратів, виготовлених з

for each of them at 0.7 M total concentration in cryoprotective solution.

Release of catalytic proteins into extracellular medium is the index of disorder in plasmatic membrane permeability and cell damages. If comparing the activity of LDG and G6PDG, determined in plasma right after PC isolation and prior to cryopreservation (Fig. 3) we consider the process of PC isolation and preservation within 18-24 hrs to be accompanied by a visible augmentation of cell damage. PC exposure with DMSO and 0.7 M 1,2-PD for 15 min does not significantly affect the activity of mentioned above enzymes in plasma, meanwhile the PC exposure with DMAC results in a considerable reduction of their activity.

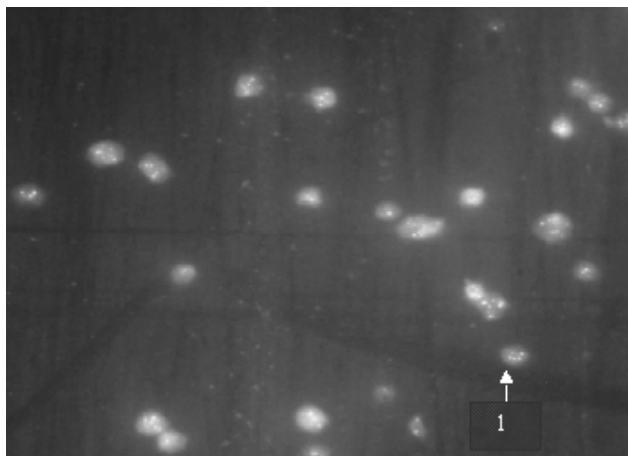
Augmentation of cytosol enzyme activity in cryoprotective medium is the sign of their release out of cells due to cryodamage and can be used in a combined assessment of cell morphofunctional integrity after cryopreservation. Freezing with all studied cryoprotectants and under their combination results in statistically and significantly greater increase in enzyme activity after cryopreservation according to the program 1, if comparing with program 2 (Fig. 3). With this test freezing with DMSO was established to be more efficient than with 1,2-PD. The level of cytosol enzyme activity after cryopreservation with DMAC and at its combination with 1,2-PD in 0.7 M total final concentration occurred to be the lowest. When investigating the effect of cryoprotectants directly on LDG and G6PDG activity we revealed DMAC as suppressing it. Taking this fact into account, we consider as incorrect to compare the results of PC cryopreservation with DMAC and those for their freezing with DMSO and 1,2-PD, since they do not affect the enzyme activity. The estimation method for the level of cell damage by the activity in a supernatant of cytosol enzymes occurs to be correct if to compare with the efficiency of freezing programs when applying one cryoprotectant under different concentrations or in comparison with freezing efficiency with different CP, which do not affect the activity of the studied enzymes.

A typical feature of platelet functional activity is the ability to accumulate organic cations. Of special perspective for studying this capability one considers the application of fluorescent derivatives of acridine, which can be accumulated in granular apparatus of platelets and released together with granular content into surrounding medium during secretion, at a release response as a result of platelet activation or damage [3]. The capability to accumulate AO was established to be quite a stable and unchanging within 3 days of PC storage at  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , but it reduced under more prolonged storage (up to 9 days) and a suspension

КТ, який перед заморожуванням зберігався 18-24 год при  $22\pm 2^\circ\text{C}$ , характеризувалася більш високим вмістом активованих та дегранульованих форм тромбоцитів і меншою кількістю гранул у них. Подібні зміни спостерігалися після експозиції КТ з розчинами КП та видалення останніх.

Морфологічне дослідження зразків після заморожування-відігрівання і видалення КП виявило наявність об'єктів, що не включають флуорохром АО (акридин-негативні), але за формою нагадують тромбоцити в стані активації (з псевдоподіями, деформовані). Вміст таких морфологічних форм був найбільшим після кріоконсервування з розчинами ДМАЦ та 1,2-ПД 0,7 М (відповідно  $53\pm 6$  та  $49\pm 8\%$ ) (рис. 5). Результат кріоконсервування з ДМСО – поява біля 30% акридин-негативних тромбоцитів, а з комбінаціями ДМАЦ і 1,2-ПД у кінцевій концентрації кожного 0,35 та 0,175 М (відповідно  $36\pm 7$  та  $43\pm 4\%$ ). Решту клітин становили гранулярні активовані та дегранульовані тромбоцити. Найбільший відсоток гранулярних клітин спостерігали після кріоконсервування з ДМСО (29%) та при комбінації ДМАЦ і 1,2-ПД у загальній кінцевій концентрації 0,7 та 0,35 М (відповідно 28 і 25%). Цитологічна картина зразку КТ, який був заморожений без кріопротектора прямим зануренням у рідкий азот, представлена на рис. 6. Більше двох третин формених елементів складають акридин-негативні тромбоцити, а решту – дегранульовані тромбоцити та їх мікроформи.

Слід підкреслити, що для експериментальних досліджень використовували КТ, які зберігалися після виділення протягом 18-24 год через необхідність проведення у повному обсязі досліджень на наявність у крові збудників трансмісивних інфекцій. Таке зберігання впливало на показники



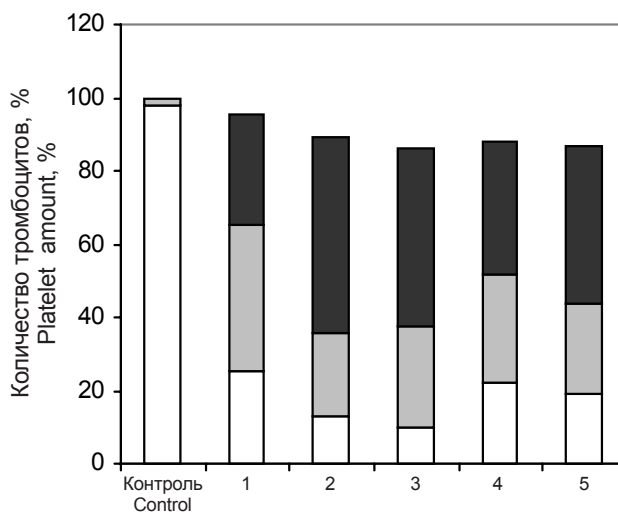
**Рис. 4.** Цитологічна картина препарату КТ зі ЗТП: 1 – неактивований гранулярний тромбоцит. Барвник – АО.  $\times 100$ .

**Fig. 4.** Cytological picture of PCs preparation from PRP: 1 – non-activated granular platelet. AO staining,  $\times 100$ .

temperature decrease down to  $0-4^\circ\text{C}$  [4, 10]. We have investigated the effect of PCs isolation and storage, their exposure with CP, freezing, thawing, CP removal on the mentioned property of platelets.

In cytological preparations, procured from PRP (Fig. 4) the ratio of morphological types of platelets is the same as for a healthy patient [3]. Cytological picture of preparations, derived from PCs, stored for 18-24 hrs at  $22\pm 2^\circ\text{C}$  before freezing, is characterised by higher content of activated and degranulated forms of platelets and lower amount of granules in it. Similar changes were noted after PC exposure with CP solutions and removing the latter.

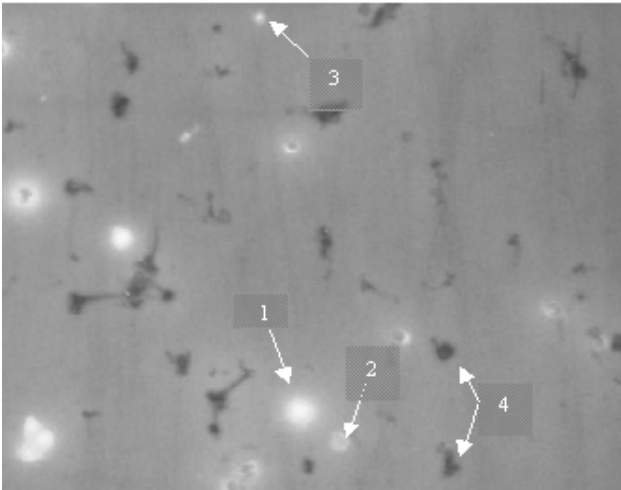
Morphological study of samples after freeze-thawing and CP removal has revealed the presence of objects, not comprising fluorochrome AO (acridine-negative), but on their shape resembling the platelets in activated state (with pseudopodia, deformed). The content of such morphological forms was the highest after cryopreservation with DMAC and 0.7 M 1,2-PD ( $53\pm 6$  and  $49\pm 8\%$ , correspondingly). Cryopreservation with DMSO resulted in appearance of about 30% acridine-negative platelets, but with DMAC and 1,2-PD combination in 0.35 and 0.175 M final concentration of each it was  $36\pm 7$  and  $43\pm 4\%$ , correspondingly. The rest of cells were granular activated and degranulated platelets. The highest percentage of granular cells was observed after cryopreservation with DMSO (29%) and when



**Рис. 5.** Кількісна збереженість та морфологічний склад тромбоцитів після кріоконсервування за програмою 2: □ – гранульовані тромбоцити; ▒ – дегранульовані; ■ – акридин-негативні; 1 – ДМСО 0,7 М; 2 – ДМАЦ 0,7 М; 3 – 1,2-ПД 0,7 М; 4 – 1,2-ПД + ДМАЦ 0,7 М; 5 – 1,2-ПД + ДМАЦ 0,35 М.

**Fig. 5.** Quantitative integrity and morphological composition of platelets after cryopreservation according to the program 2: □ – granulated; ▒ – degranulated; ■ – acridine-negative; 1 – 0.7 M DMSO; 2 – 0.7 M DMAC; 3 – 0.7 M 1,2-PD; 4 – 0.7 M 1,2-PD + DMAC; 5 – 0.35 M 1,2-PD+DMAC.





морфофункціональних властивостей кров'яних пластинок. Як свідчать одержані в роботі результати експериментальних досліджень, кріоконсервування таких КТ дозволяє отримати прийнятний рівень їх збереженості.

### Висновки

На підставі комплексу критеріїв оцінки морфофункціональних властивостей тромбоцитів проведено порівняльне дослідження кріозахисної ефективності КП (ДМСО, ДМАЦ, 1,2-ПД) та при їх комбінації на етапах кріоконсервування.

Показано, що найвищі показники збереженості тромбоцитів отримані при їх кріоконсервуванні з ДМСО та комбінації 1,2-ПД і ДМАЦ у кінцевій концентрації 0,7 М. Експериментальні дані свідчать про перспективність використання комбінацій КП, зокрема ДМАЦ і 1,2-ПД, при розробці складу кріозахисного середовища для кріоконсервування тромбоцитів.

Удосконалення програми заморожування за рахунок зняття переохолодження суспензії тромбоцитів у кріозахисних розчинах дозволяє підвищити збереженість кріоконсервованих кров'яних пластинок за більшістю показників морфофункціональної повноцінності незалежно від типу використаних КП та їх комбінації. Контрольоване заморожування суспензії тромбоцитів у температурному інтервалі кристалізації особливо важливе при зменшенні концентрації кріопротекторів.

### Література

1. Аграненко В.А., Компаниец А.М., Балежина Л.В. и др. Выделение концентратов тромбоцитов из ЛТС донорской крови и их консервирование // Гематология и трансфузиология. – 1991. – №3. – С. 29-32.
2. Азовская С.А., Суханов Ю.С., Жуковская Н.Л., Коноплина Л.А. Сравнительное изучение криопротекторных свойств диметилацетамида и диметилсульфоксида при хранении тромбоцитов в условиях умеренно низких

**Рис. 6.** Цитологічна картина препарату КТ після занурення у рідкий азот без кріопротектора: 1 – активований тромбоцит; 2 – дегранульований тромбоцит; 3 – мікроформа тромбоцита; 4 – акридин-негативні тромбоцити. ×100.

**Fig. 6.** Cytological picture of PC preparation after immersing into liquid nitrogen without cryoprotectant: 1 – activated platelet; 2 – degranulated platelet; 3 – platelet microform; 4 – acridine-negative platelets. ×100.

combining DMAC and 1,2-PD in total final concentration of 0.7 and 0.35 M (28 and 25% correspondingly). Cytological picture of PCs sample, frozen without cryoprotectant by a direct immersion into liquid nitrogen is shown in Fig. 6. More than two thirds of formed elements are acridine-negative platelets and the rest ones are degranulated platelets and their microforms.

Of note is that for experimental research we used PCs, stored after isolation within 18-24 hrs due to the necessity to study blood for transmissible infections. This storage affected the indices of morphofunctional properties of blood platelets. As testified by the results obtained in the research, the cryopreservation of such PC enables obtaining their integrity appropriate level.

### Conclusions

Basing on a complex of criteria for estimating morphofunctional properties of platelets we have carried-out a comparative study of cryoprotective efficiency of CPs (DMSO, DMAC, 1,2-PD) and when combining them under cryopreservation stages.

The highest indices of platelet preservation were shown to be obtained at their cryopreservation with DMSO and 1,2-PD and DMAC combination in 0.7 M final concentration. Experimental data testify to the perspectiveness of applying CP combination, especially DMAC and 1,2-PD when elaborating the composition of cryoprotective medium for platelet cryopreservation.

Improvement of freezing program due to the overcooling elimination of platelet suspension in cryoprotective media enables to increase the preservation rate of cryopreserved platelets according to the majority of the indices of morphofunctional integrity, independently on a type of used CPs and their combination. Controlled freezing of platelet suspension in temperature interval of crystallisation is of special importance when reducing cryoprotectant concentration.

### References

1. Agranenko V.A., Kompaniets A.M., Balezina L.V. et al. Isolation of platelet concentrates from donor blood LTS and their preservation // Gematologiya i transfuziologiya. – 1991. – N3. – P. 29-32.

- температур // Пробл. гематологии и переливания крови.– 1989.– №12.– С. 18-21.
3. *Деменко В.Д., Ладная Л.Д., Лебединец В.В., Крупенко Н.Е.* Метод люминесцентной микроскопии тромбоцитов в диагностике гемостатических нарушений у пациентов с церебральным атеросклерозом // *Врачебное дело.*– 1990.– №4.– С. 63-66.
  4. *Козлов В.К.* Лизосомоподобные  $\alpha$ -гранулы тромбоцитов: выявление при обработке акридиновым оранжевым, некоторые свойства и преобразования в ходе реакции гемокоагуляции // *Цитология.*– 1975.– Т. XVII, №7.– С. 762-767.
  5. *Компаниец А.М.* Консервирование концентратов тромбоцитов и их лечебная эффективность: Автореф. дис. ... докт. мед. наук.– М., 1992.– 52 с.
  6. *Компаниец А.М., Николенко А.В., Луговой В.И.* Криоконсервирование тромбоцитов с веществами полиолов // *Тез. II Международной конференции по криобиологии.*– Харьков, 1992.– С. 86.
  7. *Лемешко В.В., Нікітченко Ю.В., Троянова В.Н.* Особливості ішемічного пошкодження мембран та активація перекисного окислення ліпідів у міокарді щурів різного віку // *Укр. біохімічний журнал.*– 1989.– №2.– С. 98-105.
  8. *Родионова В.Л., Нікітченко Ю.В., Чуб Н.Н., Черепанов В.В.* Сукцинатдегидрогеназная и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназная активность спермы человека на этапах низкотемпературного консервирования // *Пробл. криобиологии.*– 2005.– Т. 15, №2.– С. 207-211.
  9. *Ронин В.С.* Способ окраски тромбоцитов для подсчета в счетной камере // *Лабораторное дело.*– 1983.– №1.– С. 61-62.
  10. *Трунилина Н.Н., Мурина М.А., Росчупкин Д.И. и др.* Исследование начальной агрегации и аккумуляции акридинового оранжевого в тромбоцитах при хранении тромбоцитарного концентрата с использованием гипохлорида натрия // *Гематология и трансфузиология.*– 2000.– №5.– С. 17-19.
  11. *Пат. № 4523 Україна.* МПК<sup>7</sup> АОН 1/02. Спосіб криоконсервування суспензії клітин ембріональної нервової тканини / В.І. Грищенко, А.М. Гольцев, Т.М. Гуріна, Н.М.Бабенко. Заявлено 24.05.04; Опубл. 17.01.05. – Бюл. №1.
  12. *Пат. № 15014 Україна.* МПК<sup>8</sup> АОН 1/02. Спосіб видалення криопротектора із суспензії тромбоцитів / В.І. Грищенко, А.М. Компанієць, О.В. Книш. Заявлено 18.11.2005; Опубл. 15.06.06. – Бюл. № 6.
  13. *Arnaud F.G., Hunt Ch.J., Pegg D.E.* Some effects of propane-1,2-diol on human platelets // *Cryobiology.*– 1990.– Vol. 27, N2.– P. 119-129.
  14. *Arnaud F.G., Pegg D.E.* Cryopreservation of human platelets with propane-1,2-diol // *Cryobiology.*– 1990.– Vol. 27, N2. – P. 130-136.
  15. *Balint B., Paunovic D., Vucetic D. et al.* Controlled-rate versus uncontrolled-rate freezing as predictors for platelet cryopreservation efficacy // *Transfusion.*– 2006.– Vol. 46, N2.– P. 230-235.
  16. *Baythoon H., Tuddenham E.G.D., Hutton R.A.* Morphological and functional disturbances of platelets induced by cryopreservation // *J. Clin. Patol.*– 1982.– Vol. 35, N3.– P. 870-874.
  17. *Lehuu B., Curtis-Prior P.B.* Effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on aggregation of human blood platelets // *J. Pharm. Pharmacol.*– 1987.– Vol. 39, N1.– P. 62-63.
  18. *Reid T.J., Gao D.* Symposium on cryopreservation of human platelets: an overview. Held on the 35th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Pittsburgh, Pennsylvania, July 16, 1998 // *Cryobiology.* – 1999. – Vol. 38, N3.– P. 177-179.
  19. *Shepherd K.M., Sage R.E., Barber S., O'Brien E.* Platelet cryopreservation. In vitro aggregation studies // *Cryobiology.*– 1984.– Vol. 21, N4.– P. 39-43.
  20. *Azovskaya S.A., Sukhanov Yu.S., Zhukovskaya N.L., Konoplina L.A.* A comparative study of cryoprotective properties of dimethyl acetamide and dimethyl sulfoxide at platelet storage under conditions of moderately low temperatures // *Problemy gematologii i perelivaniya krovi.*– 1989.– N12.– P. 18-21.
  3. *Demenko V.D., Ladnaya L.D., Lebedinets V.V., Krupenko N.E.* Method of luminescent microscopy for platelets in diagnosis of hemostatic disorders in patients with cerebral atherosclerosis // *Vrachebnoe delo.*– 1990.– N4.– P. 56-66.
  4. *Kozlov V.K.* Lysosome-like structures of platelets: revealing a treatment with acridine orange, some properties and rearrangements during hemocoagulation reaction // *Tsitologia.*– 1975.– Vol. XVII, N7.– P. 762-767.
  5. *Kompaniets A.M.* Preservation of platelet concentrations and their therapeutic efficiency: Author's abstract of thesis of doctor of med. sciences.– Moscow, 1992.– 52 p.
  6. *Kompaniets A.M., Nikolenko A.V., Lugovoy V.I.* Platelet cryopreservation with polyol substances // *Abstracts of 2<sup>nd</sup> International Conference on Cryobiology.*– Kharkov, 1992.– P. 86.
  7. *Lemeszko V.V., Nikitchenko Yu.V., Troyanova V.N.* Peculiarities of ischemic injuries in membranes and activation of lipid peroxidation in myocardium of rats of different age // *Ukr. Biokhim. Zhurnal.*– 1989.– N2.– P. 98-105.
  8. *Rodionova V.L., Nikitchenko Yu.V., Chub N.N., Cherepanov V.V.* Succinate-dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities of human sperm at low temperature preservation stages // *Problems of Cryobiology.*– 2005.– N2.– P. 207-211.
  9. *Ronin V.S.* Way for platelet staining to be counted in counting chamber // *Lab. delo.*– 1983.– N1.– P. 61-62.
  10. *Tronulina N.N., Murina M.A., Roschupkin D.I. et al.* Study of initial aggregation and accumulation of acridine orange in platelets during platelet concentrate storage with sodium hypochloride // *Gematologiya i transfuziologiya.*– 2000.– N5.– P. 17-19.
  11. *Patent N 4523 Ukraine. IPC<sup>7</sup> AON 1/02.* Way for cryopreservation of cell suspension of embryonic nerve tissue / V.I. Grischenko, A.N. Goltsev, T.M. Gurina, N.M. Babenko. Applied 24.05.05; Published 17.01.05.– Bull.1.
  12. *Patent N 15014 Ukraine. IPC<sup>8</sup> AON 1/02.* Way for cryoprotectant removal out of platelet suspension / V.I. Grischenko, A.M. Kompaniets, O.V. Knysh. Applied 18.11.2005; Published 15.06.06. Bull. N6.
  13. *Arnaud F.G., Hunt Ch.J., Pegg D.E.* Some effects of propane-1,2-diol on human platelets // *Cryobiology.*– 1990.– Vol. 27, N2.– P. 119-129.
  14. *Arnaud F.G., Pegg D.E.* Cryopreservation of human platelets with propane-1,2-diol // *Cryobiology.*– 1990.– Vol. 27, N2. – P. 130-136.
  15. *Balint B., Paunovic D., Vucetic D. et al.* Controlled-rate versus uncontrolled-rate freezing as predictors for platelet cryopreservation efficacy // *Transfusion.*– 2006.– Vol. 46, N2.– P. 230-235.
  16. *Baythoon H., Tuddenham E.G.D., Hutton R.A.* Morphological and functional disturbances of platelets induced by cryopreservation // *J. Clin. Patol.*– 1982.– Vol. 35, N3.– P. 870-874.
  17. *Lehuu B., Curtis-Prior P.B.* Effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on aggregation of human blood platelets // *J. Pharm. Pharmacol.*– 1987.– Vol. 39, N1.– P. 62-63.
  18. *Reid T.J., Gao D.* Symposium on cryopreservation of human platelets: an overview. Held on the 35th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Pittsburgh, Pennsylvania, July 16, 1998 // *Cryobiology.* – 1999. – Vol. 38, N3.– P. 177-179.
  19. *Shepherd K.M., Sage R.E., Barber S., O'Brien E.* Platelet cryopreservation. In vitro aggregation studies // *Cryobiology.*– 1984.– Vol. 21, N4.– P. 39-43.

Надійшла 20.12.2005

Accepted in 20.12.2005