

Криоконсервирование тромбоцитов.**2. Эффективность криоконсервантов на основе комбинаций криопротекторов при различных режимах замораживания**

UDC 612.111.7:615.014.41

O.A. BOGDANCHIKOVA, V.A. KIREEV, A.T. KHOD'KO, A.M. KOMPANIETS*

Platelet Cryopreservation.**2. Efficiency of Cryopreservatives Based on Cryoprotectant Combinations Under Different Freezing Regimens**

В работе исследовано влияние различных режимов замораживания концентрата тромбоцитов с комбинированными криозащитными средами на сохранность показателей морфофункциональной полноценности тромбоцитов. Наиболее высокие и стабильные результаты получены при режиме замораживания с высокими скоростями охлаждения, а также при отсутствии переохлаждения и быстром прохождении плато кристаллизации.

Ключевые слова: концентрат тромбоцитов, комбинированные криозащитные среды, режимы замораживания, скорости охлаждения, плато кристаллизации, переохлаждение.

У роботі досліджено вплив різних режимів заморожування концентрату тромбоцитів з комбінованими криозахисними середовищами на збереженість показників морфофункціональної повноцінності тромбоцитів. Найбільш високі і стабільні результати отримані при режимі заморожування з високими швидкостями охолодження, а також при відсутності переохолодження і швидкому проходженні плато кристалізації.

Ключові слова: концентрат тромбоцитів, комбіновані криозахисні середовища, режими заморожування, швидкості охолодження, плато кристалізації, переохолодження.

The effect of different freezing regimens of platelet concentrate with combined cryoprotective media on the indices of platelet morphofunctional integrity was studied in the research. The highest and the most stable results were obtained at freezing regimen with high cooling rates as well as with the absence of overcooling and rapid passing through the crystallization plateau.

Key words: platelet concentrate, combined cryoprotective media, freezing regimens, cooling rates, crystallization plateau, overcooling.

Анализ научных публикаций по проблеме криоконсервирования концентратов тромбоцитов (КТ) свидетельствует о том, что основное внимание исследователей было уделено выбору криопротектора и созданию на его основе эффективной криозащитной среды [20]. Результаты изучения различных скоростей охлаждения и их влияния на криоконсервирование КТ описаны лишь в единичных работах. Представлены данные замораживания КТ с низкими [3, 4, 9, 16, 22] и высокими [13, 14] скоростями охлаждения в различных криозащитных средах; предложены ступенчатые режимы замораживания КТ с разными скоростями охлаждения в определенных температурных диапазонах [12] и инициацией кристаллизации для предотвращения переохлаждения внеклеточной среды [5, 12, 15, 17].

В практике криоконсервирования КТ для клинических целей наибольшее распространение получил способ замораживания контейнеров с суспензией тромбоцитов в морозильной камере (-80°C) или парах жидкого азота ($-120\dots-150^{\circ}\text{C}$) [19, 21,

Analysis of scientific publications on the task of the cryopreservation of platelet concentrates (PCs) testified to the fact that the main attention of the researchers was targeted to the cryoprotectant selection and development of effective cryoprotective medium on its base [20]. The results on studying different cooling rates and their effect on PC cryopreservation were described only in the single papers. There were presented the data on freezing of PCs with low [3, 4, 9, 16, 22] and rapid [13, 14] cooling rates in various cryoprotective media; there were proposed the step-wise freezing regimens of PCs with different cooling rates within the established temperature ranges [12] and crystallization initiation for prevention of extracellular medium overcooling [5, 12, 15, 17].

In the practice of PC cryopreservation for the clinical purposes the container freezing method with platelet suspension in freezing chamber (-80°C) or liquid nitrogen vapors ($-120\dots-150^{\circ}\text{C}$) [19, 21, 23] was widespread. The cooling rate under these conditions is not controlled and may vary from 1 to $35^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+380 57) 373-30-07, факс: (+380 57) 373-30-84, электронная почта:
bogdanchik_11@mail.ru

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine 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: bogdanchik_11@mail.ru

23]. Скорость охлаждения в таких условиях не регулируется и может варьировать от 1 до 35°C/мин.

Следует отметить, что практически все исследования, направленные на поиск оптимальных режимов замораживания тромбоцитов, основаны на использовании в криозащитном растворе одного из криопротекторов: диметилсульфоксида (ДМСО), диметилацетамида (ДМАц), глицерина, 1,2-пропандиола (1,2-ПД) и т.д.

В работах последних лет показана перспективность использования комбинированных криозащитных сред при замораживании тромбоцитов [2, 6], определен состав криоконсервантов с высоким уровнем криозащитного действия [3].

Цель работы – исследование влияния различных режимов замораживания КТ с комбинированными криозащитными средами на сохранность показателей морфофункциональной полноценности тромбоцитов.

Материалы и методы

Объектом исследования служили КТ, выделенные из 500 мл донорской крови (гемоконсервант “Глюгидир”) методом из лейкоцитомембранного слоя [1]. Перед проведением эксперимента КТ хранили в течение 12–16 ч на автоматической мешалке (ИПКК НАН Украины) со скоростью перемешивания 2 об/мин при $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

В работе использовали криопротекторы ДМСО, ДМАц, 1,2-ПД, глицерин и оксиэтилированный глицерин со степенью полимеризации $n = 5$ (ОЭГ _{$n=5$}), очищенные и идентифицированные в ИПКК НАН Украины.

Для изучения влияния режимов замораживания на результат сохранности криоконсервированных КТ использовали комбинированные среды ДМАц/1,2-ПД, ДМАц/глицерин, ДМАц/ОЭГ _{$n=5$} (1:1) в 10%-й суммарной начальной концентрации криопротекторов в плазме.

Перед замораживанием образцы КТ медленно (при постоянном перемешивании) соединяли с криозащитными средами в соотношении 1:1 и выдерживали 30 мин при комнатной температуре. Концентрация каждого криопротектора в замораживаемой суспензии тромбоцитов составляла 2,5%.

Образцы суспензии тромбоцитов (6 мл) замораживали в полимерных контейнерах прямоугольной формы (30×100 мм) вместимостью 10 мл. Исследовали три режима замораживания: 1 – в парах жидкого азота при температуре $-40 \dots -45^\circ\text{C}$; 2 – в парах жидкого азота при температуре $-188 \dots -193^\circ\text{C}$; 3 – непосредственное погружение в жидкий азот (-196°C). Образцы КТ охлаждали в широкогорлом сосуде Дьюара, располагая контейнеры на пенопластовой термоизолирующей укладке, фиксированной на определенном экспериментально уста-

It should be noted that practically all the researches directed to the search of platelet freezing the optimal regimens were based on the application of one of the cryoprotectants as: dimethyl sulfoxide (DMSO), dimethyl acetamide (DMAc), glycerol, 1,2-propane diol (1,2-PD) *etc.*

Recently the perspective of combined cryoprotective media application at platelet freezing [2, 6] has been shown, the cryopreservative composition with a high level of cryoprotective effect has been determined [3].

The research aim was to study the effect of different regimens of PC freezing with combined cryoprotective media on the indices of platelet morphofunctional integrity.

Materials and methods

PCs derived from 500 ml of donor's blood (hemopreservative “Glygicir”) by leukocyte-platelet layer method [1] were the research object. Prior to carrying-out the experiment PCs were stored for 12–16 hrs in the automated mixer (IPC&C) with 2 rot/min mixing rate at $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

Cryoprotectants DMSO, DMAc, 1,2-PD, glycerol and oxyethylated glycerol with polymerization degree $n = 5$ (OEG _{$n=5$}), purified and identified at the IPC&C of the National Academy of Sciences of Ukraine were used in the research.

For studying the effect of freezing regimens on the result of cryopreserved PC integrity the DMAc/1,2-PD, DMAc/glycerol, DMAc/OEG _{$n=5$} (1:1) combined media in 10% total initial cryoprotectant concentration in plasma were used.

Prior to freezing the PC samples were slowly (under a constant agitating) mixed with cryoprotective media in 1:1 ratio and exposed for 30 min at room temperature. The concentration of each cryoprotectant in the frozen platelet suspension made 2.5%.

The platelet suspension samples (6 ml) were frozen in 10 ml rectangular polymer containers (30×100 mm). Three regimens of cooling were investigated: 1 – in liquid nitrogen vapors at $-40 \dots -45^\circ\text{C}$; 2 – in liquid nitrogen vapors at $-188 \dots -193^\circ\text{C}$; 3 – direct plunging into liquid nitrogen (-196°C). The samples were cooled in wide-neck Dewar's vessel, by placing the containers onto foam thermo-insulating stowage fixed on the certain experimentally established level above the liquid nitrogen surface (model laboratory freezer). The frozen samples of PCs were stored from 3 days to 3 months.

The temperature change was recorded with differential copper constantan thermocouple (diameter of copper and constantan conductors is 0.15 mm) placed in the center of frozen sample of the simulating model system. When measuring the standard thermocouple junction was in flask at 0°C . Error of tempe-

новленном уровне над зеркалом жидкого азота (лабораторная модель замораживателя). Замороженные образцы КТ хранили в жидком азоте от 3 суток до 3 месяцев.

Изменение температуры регистрировали дифференциальной медь-константановой термопарой (диаметр медного и константанового проводников 0,15 мм), расположенной в центре замораживаемого образца модельной системы-имитатора. При измерениях эталонный спай термопары находился в термосе при температуре 0°C. В данных условиях погрешность измерения температуры в диапазоне 20...–40°C составляла не более $\pm 0,35^\circ\text{C}$.

Образцы КТ размораживали на водяной бане при температуре 37°C и подсчитывали в них количество тромбоцитов [10]. Сохранность показателей морфофункциональной полноценности криоконсервированных КТ оценивали после удаления криопротекторов [11] по комплексу тестов *in vitro*: реакция на гипотонический шок (РГШ) [7], агрегация, индуцированная аденозин-дифосфат динатриевой солью (АДФ, 200 мкМ, “Serva” Германия) [18], ретракция тромбоцитарного сгустка [7]. Степень РГШ и агрегации измеряли на анализаторе “Colysagraph” (“Damon/IEC Division”, США) с графической регистрацией процесса на самописце “Endim” 622.01 (Германия). Полученные данные выражали в процентном соотношении к соответствующим показателям свежесыведенных КТ, которые принимали за 100%.

Статистический анализ результатов проводили с помощью программного пакета “Statgraphic plus for Windows” версия 5.1 с использованием критерия Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследований был проведен анализ термограмм охлаждения имитаторов – модельной криобиологической системы, представляющей собой 5%-й раствор ДМСО или 5%-е комбинированные растворы криопротекторов ДМАц/1,2-ПД, ДМАц/глицерин, ДМАц/ОЭГ_{n=5} в плазме (рис. 1).

В результате реализации режимов замораживания 1 и 2 получены термограммы, демонстрирующие разные скорости охлаждения до и после периода начальной кристаллизации, различную длительность плато кристаллизации, наличие или отсутствие переохлаждения. Анализ термограмм охлаждения модельных криобиологических систем в парах жидкого азота при температуре –40...–45°C (табл. 1) и –188...–193°C (табл. 2) свидетельствует о том, что режим замораживания 1 обеспечивает низкие скорости охлаждения (1–3°C/мин), а режим 2 – высокие (12–25°C/мин). При низких скоростях охлаждения отмечалась длительная за-

ражение measurement within the range of 20...–40°C made less than $\pm 0.35^\circ\text{C}$ under these conditions.

The samples of PCs were frozen-thawed on water bath at 37°C and a number of platelets were calculated [10]. Preservation of the morphofunctional indices of cryopreserved PC was estimated after cryoprotectants' removal [11] by *in vitro* tests: hypotonic shock reaction (HSR) [7]; aggregation, induced by adenosine diphosphate disodium salt (ADP, 200 μM , Serva Germany) [18]; retraction of platelet clot [7]. HSR and aggregation rate was measured with Colysagraph (Damon/IEC Division, USA) analyser with graphic recording of the process with Endim plotter 622.01 (Germany). The obtained data were expressed as the percentage ratio to the corresponding indices of freshly isolated PCs assumed as 100%.

The statistical analysis of results was carried-out with Statgraphic plus for Windows software version 5.1 using Mann-Whitney's criterion.

Results and discussion

At the first stage of the researches we analysed the cooling thermograms of the model cryobiological system simulators, representing either 5% solution of DMSO or 5% combined solutions of DMAc/1,2-PD, DMAc/glycerol, DMAc/OEG_{n=5} cryoprotectants in plasma (Fig. 1).

After the realization of freezing regimens 1 and 2 the thermograms were obtained, which demonstrated different cooling rates prior to and after initial crystallization; various duration of crystallization plateau; either presence or absence of supercooling. The ana-

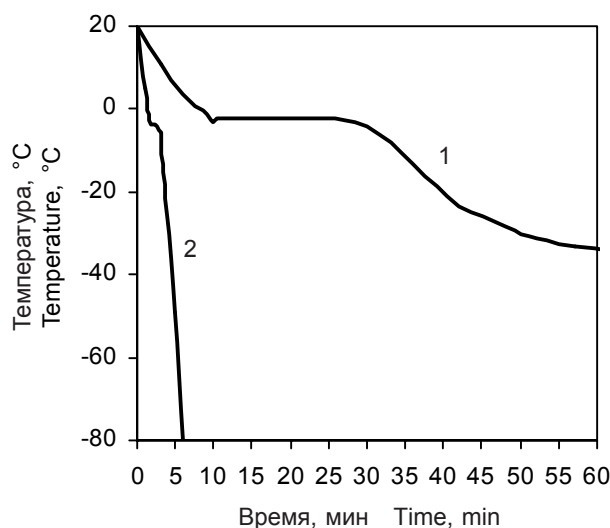


Рис. 1. Термограммы, полученные при охлаждении 5%-го раствора ДМСО в парах жидкого азота при температуре –40...–45°C (кривая 1) и –188...–193°C (кривая 2), $n = 3$.

Fig. 1. Thermograms, obtained when cooling 5% DMSO solution in liquid nitrogen vapors within the ranges –40...–45°C (curve 1) and –188...–193°C (curve 2), $n = 3$.

Таблица 1. Параметры термограмм охлаждения криозащитных сред в парах азота при температуре $-40 \dots -45^\circ\text{C}$ **Table 1.** Thermograms' parameters of cryoprotective media cooling in liquid nitrogen vapors under $-40 \dots -45^\circ\text{C}$

Параметр Parameter		ΔMCO DMSO	$\Delta\text{MAц/ОЭГ}_{n=5}$ $\text{DMAc/OEG}_{n=5}$	$\Delta\text{MAц/глицерин}$ DMAc/glycerol	$\Delta\text{MAц/1,2-ПД}$ DMAc/1,2-PD
Скорость охлаждения, градус/мин Cooling rate, degree/min	От 20°C до $T_{\text{сп}}^\circ\text{C}$ From 20°C down to T_{cr}	$2,4 \pm 0,7$	$2,1 \pm 0,6$	$3,0 \pm 0,5$	$2,7 \pm 0,3$
	От $T_{\text{сп}}^\circ\text{C}$ до $-6 \dots -7^\circ\text{C}$ From T_{cr} down to $-6 \dots -7^\circ\text{C}$	$0,35 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,2$	$0,27 \pm 0,08$	$0,25 \pm 0,08$
	От $-6 \dots -7^\circ\text{C}$ до -40°C From $-6 \dots -7^\circ\text{C}$ down to -40°C	$1,2 \pm 0,5$	$2,0 \pm 0,6$	$1,2 \pm 0,5$	$1,8 \pm 0,8$
$T_{\text{сп}}^\circ\text{C}$ $T_{\text{cr}}^\circ\text{C}$	-3	-2	-2,5	-2,4	
$\Delta T, ^\circ\text{C}$	1	0	1°C	1,2	
Задержка на плато кристаллизации, мин Delay at crystallization plateau, min	20 ± 2	17 ± 2	11 ± 2	16 ± 2	

Примечание: $T_{\text{кр}}$ – температура начала кристаллизации; ΔT – степень переохлаждения.

Note: T_{cr} – crystallization onset temperature; ΔT – supercooling rate.

держка температуры на уровне плато кристаллизации (11–20 мин) с предшествующим переохлаждением внеклеточной среды (см. табл. 1); при высоких – длительность плато кристаллизации сокращалась, переохлаждение отсутствовало (см. табл. 2). При замораживании образцов непосредственным погружением в жидкий азот скорость охлаждения составляет 210 градусов/мин (характеристика данного режима замораживания 3 не представлена).

lysis of cooling thermograms of model cryobiological systems in liquid nitrogen vapors at $-40 \dots -45^\circ\text{C}$ (Table 1) and $-188 \dots -193^\circ\text{C}$ (Table 2) testifies to the fact that freezing regimen 1 provides low cooling rates (1–3 degree/min), and regimen 2 does high ones (12–25 degree/min). At low cooling rates there was noted the long-term temperature delay at the level of crystallization plateau (11–20 min) with previous supercooling of extracellular medium (Table 1); at high rates the duration of crystallization plateau reduced and super-

Таблица 2. Параметры термограмм охлаждения криозащитных сред в парах азота при температуре $-188 \dots -193^\circ\text{C}$ **Table 2.** Thermograms' parameters of cryoprotective media cooling in liquid nitrogen vapors under $-188 \dots -193^\circ\text{C}$

Параметр Parameter		ΔMCO DMSO	$\Delta\text{MAц/ОЭГ}_{n=5}$ $\text{DMAc/OEG}_{n=5}$	$\Delta\text{MAц/глицерин}$ DMAc/glycerol	$\Delta\text{MAц/1,2-ПД}$ DMAc/1,2-PD
Скорость охлаждения, градус/мин Cooling rate, degree/min	От 20°C до $T_{\text{сп}}^\circ\text{C}$ From 20°C down to T_{cr}	$12,25 \pm 1,35$	$11,8 \pm 1,5$	$12,9 \pm 2$	$14,7 \pm 1$
	От $T_{\text{сп}}^\circ\text{C}$ до $-6 \dots -7^\circ\text{C}$ From T_{cr} down to $-6 \dots -7^\circ\text{C}$	$4,05 \pm 1,9$	$1,7 \pm 0,85$	$3,85 \pm 1,75$	5 ± 2
	От $-6 \dots -7^\circ\text{C}$ до -40°C From $-6 \dots -7^\circ\text{C}$ down to -40°C	$25 \pm 5,2$	$24,7 \pm 5,0$	$22,25 \pm 4,65$	$20,2 \pm 5,3$
$T_{\text{сп}}^\circ\text{C}$ $T_{\text{cr}}^\circ\text{C}$	-3,0	-2,2	-2,4	-3	
$T, ^\circ\text{C}$	0	0	0°C	0	
Задержка на плато кристаллизации, мин Delay at crystallization plateau, min	$0,75 \pm 0,25$	$2,125 \pm 0,375$	$1,0 \pm 0,25$	$1,5 \pm 0,25$	

Примечание: $T_{\text{кр}}$ – температура начала кристаллизации; ΔT – степень переохлаждения.

Note: T_{cr} – crystallization onset temperature; ΔT – supercooling rate.

Наличие или отсутствие в модели криобиологической системы (плазма/криопротектор) тромбоцитов практически не влияет на параметры термомограмм охлаждения, что позволяет использовать полученные экспериментальные данные при анализе результатов криоконсервирования суспензии тромбоцитов.

После криоконсервирования образцов КТ с применением разных режимов замораживания в 5%-м растворе ДМСО и 5%-х комбинированных криозащитных средах ДМАц/1,2-ПД, ДМАц/глицерин и ДМАц/ОЭГ_{n=5} определена высокая количественная сохранность тромбоцитов (табл. 3). Смена режима замораживания КТ не оказывала существенного влияния на результат количественной сохранности тромбоцитов в деконсервированных образцах.

Показатели морфофункциональной полноценности тромбоцитов – степень АДФ-агрегации, степень РГШ и ретракции сгустка зависели от таких параметров охлаждения, как скорость охлаждения в разных температурных диапазонах, степень переохлаждения, длительность плато кристаллизации.

Степень АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, криоконсервированных с комбинированными средами, была значительно выше при режиме замораживания 2 по сравнению с режимом 1 (рис. 2), тогда как для ДМСО подобных различий не установлено. Анализ типичных агрегатограмм (рис. 3) свидетельствует о том, что режим замораживания 2 позволяет получить после криоконсервирования более высокие параметры агрегационной активности тромбоцитов: степени АДФ-агрегации, начальной скорости образования агрегатов, фазы изменения формы (lag-фаза) – дискоферотрансформации, которая косвенно подтверждает наличие дискоцитов в суспензии деконсервированных тромбоцитов. Самые высокие исследуемые параметры получены для криоконсерванта ДМАц/ОЭГ_{n=5}.

Установлена зависимость сохранности степени РГШ от режимов замораживания (рис. 4). Для комбинированных криозащитных сред ДМАц/1,2-ПД и ДМАц/ОЭГ_{n=5} большая степень РГШ получена при использовании режима замораживания 2 (54,9 ± 5,5 и 69,7 ± 11,5% соответственно); ДМСО – режима 1 (49,0 ± 9,6%). Для криоконсерванта ДМАц/глицерин подобной зависимости не установлено.

После криоконсервирования образцов КТ с растворами ДМАц/1,2-ПД, ДМАц/глицерин и ДМАц/ОЭГ_{n=5} ретракция тромбоцитарного сгустка была значительно выше при режиме замораживания 2.

Таблица 3. Количество криоконсервированных тромбоцитов в зависимости от режима замораживания (% от свежесыведенных, $M \pm y, n=5$)

Table 3. Frozen-thawed platelet amount depending on freezing regimen (% of fresh platelets, $M \pm y, n=5$)

Состав криоконсерванта Composition of cryopreservative	Режим замораживания Freezing regimen		
	1	2	3
ДМАц/1,2-ПД DMAc/1,2-PD	86,0 ± 9,2	91,0 ± 2,6	89,7 ± 4,2
ДМАц/глицерин DMAc/glycerol	91,7 ± 4,0	90,0 ± 5,0	86,3 ± 5,9
ДМАц/ОЭГ _{n=5} DMAc/OEG _{n=5}	90,3 ± 6,5	95,5 ± 5,0	91,0 ± 8,2
ДМСО DMSO	92,8 ± 5,9	93,4 ± 3,8	86,4 ± 4,3

cooling was absent (Table 2). During the sample freezing by direct plunging into liquid nitrogen the cooling rate was 210 degree/min (details of freezing regimen 3 are not presented).

Either presence or absence of the platelets in the model of cryobiological system (plasma/cryoprotectant) do not practically affect the parameters of cooling thermogram, enabling to use the obtained experimental data when analyzing the platelet suspension cryopreservation results.

After cryopreservation of PC samples using different freezing regimens in 5% DMSO solution and 5% combined cryoprotective media as DMAc/1,2-PD, DMAc/glycerol, DMAc/OEG_{n=5} there was established a high level of platelet number preservation (Table 3). The change of PC freezing regimen did not significantly affect the level of platelet number preservation in the frozen-thawed samples.

The indices of platelet morphofunctional integrity (ADP-aggregation, HSR and retraction clot rate) depended on cooling parameters such as: cooling rate within the different temperature ranges, supercooling rate, duration of crystallization plateau.

The rate of ADP-induced aggregation of platelets, cryopreserved with combined media was significantly higher with freezing regimen 2 if compared with the freezing regimen 1 (Fig. 2), whereas in case of DMSO the established differences were not similar. The analysis of typical aggregatograms (Fig. 3) testifies to the fact that freezing regimen 2 enables to obtain the higher post-thaw values of platelet aggregation activity: ADP aggregation rate, initial rate of aggregate formation, shape changing phase (lag-phase, discosphere transformation), that indirectly points to the presence of discocytes in platelet frozen-thawed suspension. The highest studied parameters were obtained for the DMAc/OEG_{n=5} cryopreservative.

It was established the dependence of HSR rate preservation on freezing regimens (Fig. 4). A higher

После замораживания образцов КТ путем прямого погружения контейнеров в жидкий азот (режим 3) тромбоциты практически полностью утрачивали агрегационную способность, характеризовались низкой степенью РГШ и ретракции тромбоцитарного сгустка (см. рис. 2, 4, 5).

Анализ особенностей термограмм двух режимов замораживания и их сопоставление с результатами криоконсервирования КТ позволяют предположить, что неблагоприятными факторами при режиме замораживания 1 являются длительное плато кристаллизации и наличие переохлаждения. Это подтверждается сходными показателями морфофункциональной полноценности тромбоцитов, полученными после замораживания образцов КТ с медленной регулируемой скоростью охлаждения на программном замораживателе [2]. Криоконсервирование КТ с использованием режима замораживания 2 предпочтительнее, так как обеспечивает более высокие показатели морфофункциональной полноценности тромбоцитов. Полагаем, что размещение контейнеров с суспензией тромбоцитов на укладке в парах жидкого азота при температуре $-188...-193^{\circ}\text{C}$ обеспечивает сильное локальное охлаждение стенок контейнера, что позволяет в режиме замораживания 2 полностью избежать переохлаждения и способствует быстрому прохождению плато кристаллизации (1–2,5 мин). Отметим, что такой прием используется при управлении началом фазового перехода вода-лед для предотвращения нежелательного переохлаждения внеклеточной среды [8].

Криоконсервирование тромбоцитов в присутствии ДМСО происходило успешнее при использовании как медленного регулируемого охлаждения

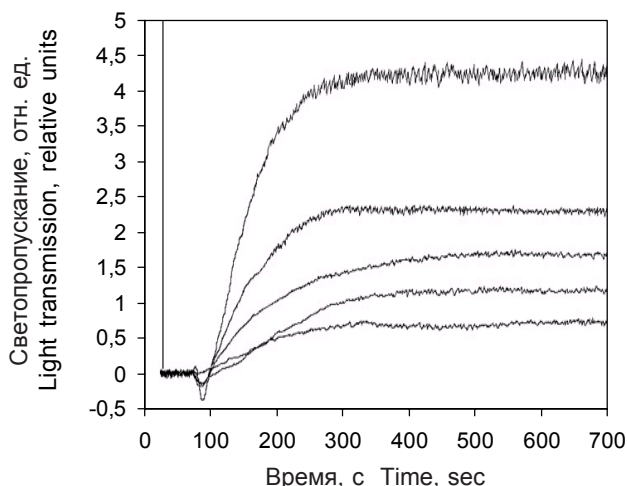


Рис. 3. Типичные агрегатограммы, полученные при регистрации АДФ-индуцируемой агрегации тромбоцитов до и после замораживания в парах жидкого азота: а – режим 1; б – режим 2; 1 – ДМАц/1,2-ПД; 2 – ДМАц/глицерин; 3 – ДМАц/ОЭГ_{n=5}; 4 – ДМСО.

Fig. 3. Typical aggregatograms, obtained under recording of ADP-induced platelet aggregation prior to and after freezing in liquid nitrogen vapors: a – regimen 1; b – regimen 2; 1 – DMAC/1,2-PD; 2 – DMAC/ glycerol; 3 – DMAC/OEG_{n=5}; 4 – DMSO.

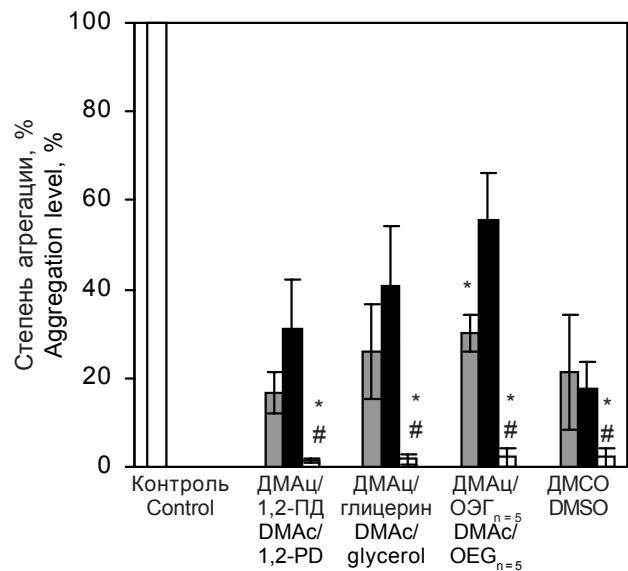
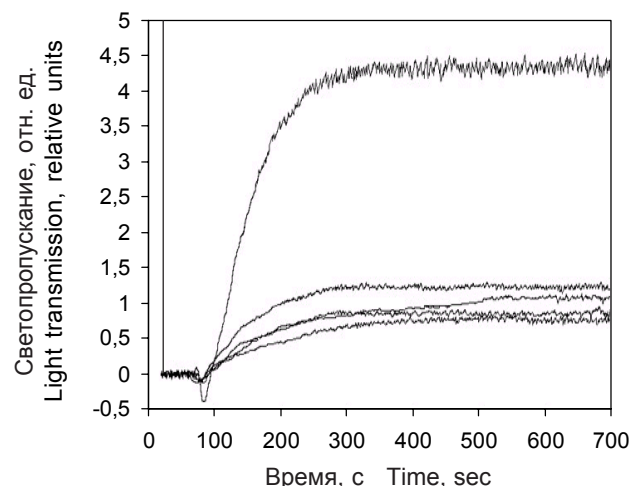


Рис. 2. Степень агрегации криоконсервированных тромбоцитов, индуцированной АДФ в зависимости от режима замораживания ($M \pm y, n=5$): ■ – режим 1; ■ – режим 2; □ – режим 3; #, * – отличия статистически достоверны по сравнению с соответствующим показателем для режимов 1 и 2 соответственно, $P_U < 0,05$.

Fig. 2. ADP induced aggregation extent of frozen-thawed platelets, depending on freezing regimen ($M \pm y, n=5$): ■ – regimen 1; ■ – regimen 2; □ – regimen 3; #, * – differences are statistically significant if compared with corresponding index for regimens 1 and 2, correspondingly, $P_U < 0,05$.

HSR rate in the case of using DMAC/1,2-PD and DMAC/OEG_{n=5} combined cryoprotective media was obtained during the use of freezing regimen 2 (54.9 ± 5.5 and $69.7 \pm 11.5\%$, correspondingly); DMSO with regimen 1 ($49.0 \pm 9.6\%$). No similar dependence was found for DMAC/glycerol cryopreservative.



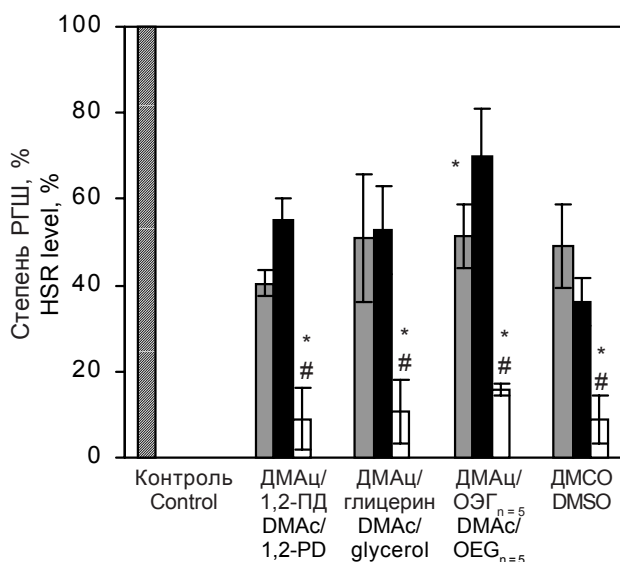


Рис. 4. Степень РГШ криоконсервированных тромбоцитов в зависимости от режима замораживания ($M \pm y$, $n = 5$): ■ – режим 1; ■ – режим 2; □ – режим 3; #, * – отличия статистически достоверны по сравнению с соответствующим показателем для режимов 1 и 2 соответственно, $P_u < 0,05$.

Fig. 4. HSR extent of cryopreserved platelets depending on freezing regimen ($M \pm y$, $n = 5$): ■ – regimen 1; ■ – regimen 2; □ – regimen 3; #, * – differences are statistically significant if compared with corresponding index for regimens 1 and 2 correspondingly, $P_u < 0,05$.

[2], так и медленного нерегулируемого охлаждения в парах жидкого азота (режим 1). Возможно, это обусловлено несколькими причинами: предпочтительностью использования медленных скоростей охлаждения применительно к замораживанию с криопротектором ДМСО, что справедливо и для других клеточных суспензий; целесообразностью выдерживания определенной длительности плато кристаллизации при замораживании тромбоцитов с ДМСО [15–17].

Результаты криоконсервирования тромбоцитов, полученные в данной и других работах [2, 3], свидетельствуют об эффективности криозащитных сред, содержащих комбинации криопротекторов. Тем более, что объектом замораживания были КТ, хранившиеся 12–16 ч после выделения и в которых в определенной степени могли развиваться повреждения – “storage lesion” [7].

Выводы

Таким образом, данные настоящей серии экспериментов свидетельствуют о более высоких и стабильных результатах криоконсервирования тромбоцитов с комбинированными криозащитными средами при использовании режима замораживания с высокими скоростями охлаждения, а также при отсутствии переохлаждения и быстром прохождении плато кристаллизации.

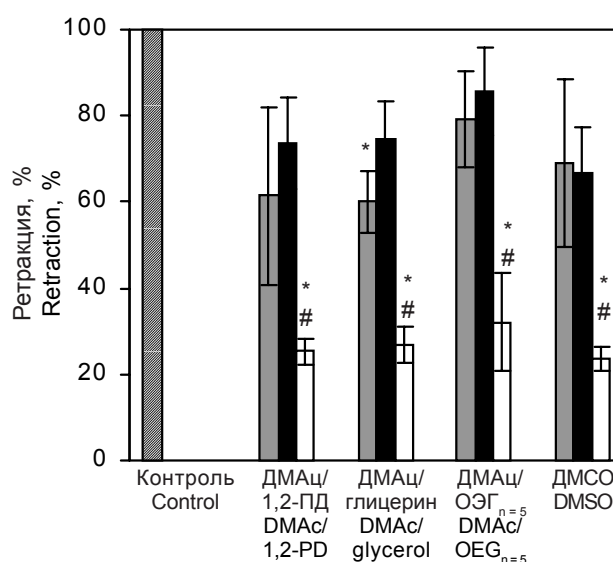


Рис. 5. Ретракция криоконсервированных тромбоцитов в зависимости от режима замораживания ($M \pm y$, $n = 5$): ■ – режим 1; ■ – режим 2; □ – режим 3; #, * – отличия статистически достоверны по сравнению с соответствующим показателем для режимов 1 и 2 соответственно, $P_u < 0,05$.

Fig. 5. Retraction of cryopreserved platelets depending on freezing regimen ($M \pm y$, $n = 5$): ■ – regimen 1; ■ – regimen 2; □ – regimen 3; #, * – differences are statistically significant if compared with corresponding index for regimens 1 and 2 correspondingly, $P_u < 0,05$.

After cryopreservation of PC samples with DMAc/1,2-PD, DMAc/glycerol and DMAc/OEG_{n=5} solution the retraction of platelet clot was significantly higher in the case of the freezing regimen 2.

After freezing of PC samples by a direct plunging the containers into liquid nitrogen (regimen 3) the platelets completely lost the aggregation ability, and were characterized with low HSR rate and retraction of platelet clot (Fig. 2, 4, 5).

The analysis of peculiarities of thermogram for two freezing regimens and their correlation with results of PC cryopreservation enable to suggest that freezing regimen 1 has such adverse factors as prolonged crystallization plateau and appearance of supercooling. This is confirmed with similar indices of platelet morphofunctional integrity, obtained after PC samples freeze-thawing using controlled-rate slow cooling with the programmed freezer [2]. PC cryopreservation with the freezing regimen 2 is more preferable, since it provides higher indices of platelet morphofunctional integrity. We suggest that placing the containers with platelet suspension onto the stowage in liquid nitrogen vapors at $-188 \dots -193^\circ\text{C}$ provides an intensive local cooling of the container walls, that enables the freezing regimen 2 to avoid completely the supercooling and promote the rapid passing through the crystallization plateau (1–2.5 min). It should be noticed that this method is used to control the onset of water-ice phase

Представленная работа указывает на необходимость продолжения исследований режимов замораживания с регулируемыи и нерегулируемыи скоростями охлаждения в разных температурных диапазонах для определения оптимальных программ криоконсервирования КТ с целью использования в клинической практике.

Литература

1. Аграненко В.А., Компаниец А.М., Балежина Л.В. Выделение концентратов тромбоцитов из ЛТС донорской крови и их консервирование // Гематология и трансфузиология.– 1991.– Т.36, №3.– С.29–32.
2. Богданчикова О.А., Гурина Т.М., Компаниец А.М. Замораживание тромбоцитов в криозащитных средах, содержащих различные комбинации криопротекторов // Проблемы криобиологии.– 2008.– Т. 18, №1.– С.109–113.
3. Богданчикова О.А., Компаниец А.М. Криоконсервирование тромбоцитов. 1. Разработка криоконсервантов на основе комбинаций криопротекторов и исследование их эффективности // Проблемы криобиологии.– 2009.– Т.19, №3.– С.324–337.
4. Воробьева Г.С., Компаниец А.М., Ивашков В.И. Разработка метода криоконсервирования тромбоцитов с ДМАЦ для клинических целей // Консервирование крови и ее компонентов / Под ред. О.К. Гаврилова, В.А. Аграненко.– М., 1981.– С. 77–78.
5. Компанієць А.М., Ніколенко О.В., Кошій С.В. Цитотоксичність і криозахисна ефективність алкоксипохідних гліцерину при заморожуванні тромбоцитів // Тези І З'їзду Укр. товариства криобіології і криомедицини.– Харків, 1995.– С. 105–107.
6. Компанієць А.М., Книш О.В., Гурина Т.М. та інш. Дослідження морфофункціональної збереженості тромбоцитів на етапах криоконсервування // Проблемы криобиологии.– 2006.– Т.16, №2.– С. 182–191.
7. Компаниец А.М. Консервирование концентратов тромбоцитов и их лечебная эффективность: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.– М., 1992.– 52 с.
8. Олейник С.Т. Иницирование фазового перехода вода-лед в биологических системах при низкотемпературной консервации: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1987.– 16 с.
9. Пушкарь Л.Н., Абергауз Н.Н., Воробьева Г.С. и др. Экспериментальное изучение криоконсервирующих растворов с ДМАЦ для долгосрочного хранения тромбоцитов и лейкоцитов // II Всесоюзный съезд гематологов и трансфузиологов.– М., 1985.– С. 63–64.
10. Ронин В.С. Способ окраски тромбоцитов для подсчета в счетной камере // Лаб. дело.– 1983.– №1.– С. 61–62.
11. Пат. № 15014 Україна, МПК⁸ А0N 1/02. Спосіб видалення криопротектора із суспензії тромбоцитів / В.І. Грищенко, А.М. Компанієць, О.В. Книш. Заявлено 18.11.05; Опубл. 15.06.06. – Бюл. №6.
12. Пат. № 3664 Україна, МПК⁸ А61K 35/14. Спосіб консервування тромбоцитів / А.М. Компанієць, О.В. Ніколенко, С.Т. Олійник та інш. Заявлено 22.03.93; Опубл. 27.12.94.– Бюл. №6.
13. Arnaud F.G., Pegg D.E. Cryopreservation of human platelets with 1.4 M glycerol at –75 degrees C in PVC blood packs // Thromb. Res.– 1990.– Vol. 57, N6.– P. 919–924.
14. Arnaud F.G., Pegg D.E. Cryopreservation of human platelets with propane-1,2-diol // Cryobiology.– 1990.– Vol. 27, N2. – P. 130–136.

transition when preventing the adverse supercooling of extracellular medium [8].

Freeze-thawing of platelets in presence of DMSO was more successful if using either controlled-rate slow cooling [2] or non-controlled-rate slow cooling in liquid nitrogen vapors (regimen 1). It is likely caused by some reasons such as: preference of slow cooling rate usage during the freezing with DMSO, that is also true for other cell suspensions; expediency of certain duration of crystallization plateau during platelet freezing with DMSO [15–17].

The results of platelets' cryopreservation, reported in this and other papers [2, 3] testify to the efficiency of cryoprotective media, containing cryoprotectants' combinations. Moreover, the objects of freezing were PCs, stored for 12–16 hrs after derivation and in which to some extent the 'storage lesion' could develop [7].

Conclusions

Thus, the data of these series of the experiments testify to higher and more stable results of platelet cryopreservation with the combined cryoprotective media using the freezing regimens with rapid cooling rates, as well as during overcooling and rapid passing through crystallization plateau.

The presented work points to the necessity to continue the studies of freezing regimens with controlled and non-controlled cooling rates within the temperature ranges for determination of the optimal programs of PC cryopreservation for the application in clinical practice.

References

1. Agranenko V.A., Kompaniets A.M., Balezina L.V. Derivation of platelet concentrates from LTL of donor's blood and their preservation // Gematol. Transfusiol.– 1991.– Vol. 36, N3.– P. 29–32.
2. Bogdanchikova O.A., Gurina T.M., Kompaniets A.M. Blood platelet freezing under cryoprotective media with different combinations of cryoprotectants // Problems of Cryobiology.– 2008.– Vol. 18, N1.– P. 109–113.
3. Bogdanchikova O.A., Kompaniets A.M. Platelet cryopreservation. 1. Development of cryopreservative solutions, based on cryoprotectant combination and study of their efficiency// Problems of Cryobiology.– 2009.– Vol. 19, N3.– P. 324–337.
4. Vorob'eva G.S., Kompaniets A.M., Ivashkov V.I. Designing the method of platelet cryopreservation with DMAC for clinical purposes // Preservation of blood and its components / Ed. by O.K. Gavrilova, V.A. Agranenko.– Moscow, 1981.– P. 77–78.
5. Kompaniets A.M., Nikolenko O.V., Koschiy S.V. Cytotoxicity and cryoprotective efficiency of glycerol alkoxyderivatives under platelet freezing: The 1st Congress of Ukrainian Society in Cryobiology and Cryomedicine. – Kharkov, 1995.– P. 105–107.
6. Kompaniets A.M., Knysh O.V., Gurina T.M. et. al. Study of morphofunctional integrity of platelets at cryopreservation stages // Problems of Cryobiology.– 2006.– Vol.16, N2.– P. 182–191.

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. *Balint B., Vucetic D., Trajkovic-Lakic Z. et al.* Quantitative, functional, morphological and ultrastructural recovery of platelets as predictor for cryopreservation // *Haematologia (Budap).*– 2002.– Vol.32, N4.– P. 363–375.
17. *Balint B., Vucetic D., Vojvodic D. et al.* Cell recovery, cryothermal micro-damages and surface antigen expression as predictors for cold-induced GPIIb α /CD42b-cluster mediated platelet clearance after controlled-rate vs. uncontrolled-rate cryopreservation // *Blood Banking Transfus. Med.*– 2004.– Vol. 2, N1.– P. 22–26.
18. *Born G.V.R., Cross M.J.* The aggregation of blood platelets // *J. Physiol.*– 1963.– Vol. 168, N1.– P. 178–195.
19. *Borzini P., Lazzaro A., Mazzucco L. et al.* Platelet cryopreservation using second-messenger effectors and low-dose (2%) dimethyl sulfoxide. In vitro evaluation of post-thawing platelet activity with the platelet function analyzer// *Haematologica.*– 2000.– Vol. 85, N8.– P. 885–887.
20. *Gao D.Y., Neff K., Xiao H.Y. et al.* Development of optimal techniques for cryopreservation of human platelets. I. Platelet activation during cold storage (at 22 and 8 degrees C) and cryopreservation // *Cryobiology.*– 1999.– Vol. 38, N3.– P. 225–235.
21. *Currie L.M., Livesey S.A., Harper J.R. et al.* Cryopreservation of single-donor platelets with a reduced dimethyl sulfoxide concentration by the addition of second-messenger effectors: enhanced retention of in vitro functional activity// *Transfusion.*– 1998.– Vol. 38, N2.– P. 160–167.
22. *Schiffer C.A., Anderson K. C., Bennett C. L. et al.* Platelet Transfusion for Patients With Cancer: Clinical Practice Guidelines of the American Society of Clinical Oncology // *Journal of Clinical Oncology.*–2001. Vol. 19, N5.– P. 1519–1538.
23. *Xiao H., Harvey K., Labarrere C.A. et al.* Platelet cryopreservation using a combination of epinephrine and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants // *Cryobiology.*– 2000.– Vol. 41, N2.– P. 97–105.
7. *Kompaniets A.M.* Platelet concentrates preservation and their therapeutic efficiency: Abstract of the thesis of cand. med. sci.– Moscow, 1992.– 52 p.
8. *Olejnik S.T.* Initiation of water-ice phase transition in biological systems under low-temperature preservation: Author's abstract of the thesis of candidate of biological sciences.– Kharkov, 1987.– 16 p.
9. *Pushkar L.N., Abergauz N.N., Vorob'eva G.S. et al.* Experimental study of cryopreservative solutions with DMAC for long-term storage of platelets and leukocytes // The 2nd All-Union Congress of Hematologists and Transfusiologists.– Moscow, 1985.– P. 63–64.
10. *Ronin V.S.* Method of platelet staining for calculation in counting chamber// *Lab. Delo.*– 1983.– N1.– P. 61–62.
11. Patent 15014 (Ukraine), IPC8 AON 1/02. Method of cryoprotectant elimination from platelet suspension / V.I. Grischenko, A.M. Kompaniets, O.V. Knysh. Applied 18.11.05; Publ. 15.06.06.– Bull. N6.
12. *Patent 3664 (Ukraine), IPC5 A61K 35/14.* Method of platelet preservation / A.V. Kompaniets, O.V. Nikolenko, S.T. Olijnyk *et al.* Filed 22.03.93; Publ. 27.12.94.– Bull. N6.
13. *Arnaud F.G., Pegg D.E.* Cryopreservation of human platelets with 1.4 M glycerol at –75 degrees C in PVC blood packs // *Thromb. Res.*– 1990.– Vol. 57, N6.– P. 919–924.
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. *Balint B., Vucetic D., Trajkovic-Lakic Z. et al.* Quantitative, functional, morphological and ultrastructural recovery of platelets as predictor for cryopreservation // *Haematologia (Budap).*– 2002.– Vol.32, N4.– P. 363–375.
17. *Balint B., Vucetic D., Vojvodic D. et al.* Cell recovery, cryothermal micro-damages and surface antigen expression as predictors for cold-induced GPIIb α /CD42b-cluster mediated platelet clearance after controlled-rate vs. uncontrolled-rate cryopreservation // *Blood Banking Transfus. Med.*– 2004.– Vol. 2, N1.– P. 22–26.
18. *Born G.V.R., Cross M.J.* The aggregation of blood platelets // *J. Physiol.*– 1963.– Vol. 168, N1.– P. 178–195.
19. *Borzini P., Lazzaro A., Mazzucco L. et al.* Platelet cryopreservation using second-messenger effectors and low-dose (2%) dimethyl sulfoxide. In vitro evaluation of post-thawing platelet activity with the platelet function analyzer// *Haematologica.*– 2000.– Vol. 85, N8.– P. 885–887.
20. *Gao D.Y., Neff K., Xiao H.Y. et al.* Development of optimal techniques for cryopreservation of human platelets. I. Platelet activation during cold storage (at 22 and 8 degrees C) and cryopreservation // *Cryobiology.*– 1999.– Vol. 38, N3.– P. 225–235.
21. *Currie L.M., Livesey S.A., Harper J.R. et al.* Cryopreservation of single-donor platelets with a reduced dimethyl sulfoxide concentration by the addition of second-messenger effectors: enhanced retention of in vitro functional activity// *Transfusion.*– 1998.– Vol. 38, N2.– P. 160–167.
22. *Schiffer C.A., Anderson K. C., Bennett C. L. et al.* Platelet Transfusion for Patients With Cancer: Clinical Practice Guidelines of the American Society of Clinical Oncology // *Journal of Clinical Oncology.*–2001. Vol.19, N5.– P. 1519–1538.
23. *Xiao H., Harvey K., Labarrere C.A. et al.* Platelet cryopreservation using a combination of epinephrine and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants // *Cryobiology.*– 2000.– Vol. 41, N2.– P. 97–105.

*Поступила 16.11.2010
Рецензент И.П. Высеканцев*

Accepted in 16.11.2010