

УДК 577.422:612.111:57.043

Ю.С. Пахомова, В.В. Чеканова, А.М. Компаниец*

Криозащитные свойства растворов на основе непроникающего ОЭГ_{n=25} в комбинации с проникающими криопротекторами при замораживании эритроцитов человека

UDC 577.422:612.111:57.043

Yu.S. Pakhomova, V.V. Chekanova, A.M. Kompaniets*

Cryoprotective Properties of Solutions Based on Non-Penetrative OEG_{n = 25} Combined with Penetrating Cryoprotectants During Freezing of Human Erythrocytes

Реферат: Исследована криозащитная эффективность криоконсервантов на основе комбинации экстрацеллюлярного криопротектора оксиэтилированного глицерина со степенью полимеризации $n = 25$ (ОЭГ_{n = 25}) с проникающими криопротекторами 1,2-пропандиолом (1,2-ПД), диметилсульфоксидом (ДМСО) и диметилацетамидом (ДМАц) при замораживании эритроцитов. Замораживание-отогрев в растворах на основе ОЭГ_{n=25} и 1,2-ПД, ДМСО или ДМАц в соотношении 5:1, а также ДМАц в соотношении 2:1 и 1:1 приводило к уменьшению осмотической хрупкости размороженных эритроцитов. По показателям гемолиза и содержания свободного гемоглобина наиболее высокий уровень сохранности криоконсервированных эритроцитов установлен для 30%-го раствора ОЭГ_{n = 25}.

Ключевые слова: эритроциты, криоконсервирование, комбинированные криозащитные среды, оксиэтилированный глицерин.

Реферат: Досліджена криозахисна ефективність криоконсервантів на основі комбінації екстрацелюлярного криопротектора оксиетильованого глицерину зі ступенем полімеризації $n=25$ (ОЕГ_{n = 25}) та проникаючих криопротекторів 1,2-пропандіолу (1,2-ПД), диметилсульфоксиду (ДМСО) і диметилацетаміду (ДМАц) при заморожуванні еритроцитів. Заморожування-відігрів в розчинах на основі ОЕГ_{n=25} та 1,2-ПД, ДМСО або ДМАц у співвідношенні 5:1, а також ДМАц у співвідношенні 2:1 та 1:1 призводило до зменшення осмотичної крихкості розморожених еритроцитів. За показниками гемолізу та вільного гемоглобіну найбільш високий рівень збереженості криоконсервованих еритроцитів встановлено для 30%-го розчину ОЕГ_{n = 25}.

Ключові слова: еритроцити, криоконсервування, комбіновані криозахисні середовища, оксиетильований глицерин.

Abstract: Cryoprotective efficiency of cryopreservatives, based on combination of extracellular cryoprotectant oxyethylated glycerol with polymerization degree $n = 25$ (OEG_{n = 25}) with penetrating cryoprotectants 1,2-propanediol (1,2-PD), dimethyl sulphoxide (DMSO) and dimethyl acetamide (DMAc) during red blood cells freezing was studied. Freeze-thawing in solutions of OEG_{n=25} and 1,2-PD, DMSO and DMAc mixed in 5:1 ratio, as well as with DMAc in ratios of 2:1 and 1:1 resulted in the reduction of osmotic fragility of red blood cells comparing to non-treated cells. The highest level of post-thaw survival of red blood cells according to indices of hemolysis and content of free hemoglobin was found for 30% OEG_{n=25} solution.

Key words: red blood cells, cryopreservation, combined cryoprotective solutions, oxyethylated glycerol.

Создание новых эффективных методов криоконсервирования и долгосрочного хранения компонентов донорской крови, в том числе эритроцитов, можно отнести к одному из актуальных направлений развития трансфузионной медицины XXI века [37]. Ввиду беспрецедентного распространения опасных инфекций и заболеваний, передающихся с кровью (гепатиты В, С, СПИД и т.д.), постоянного уменьшения численности доноров и старения населения внимание специалистов все больше

Development of new effective methods for cryopreservation and long-term storage of blood components, including red blood cells (RBCs), can be attributed to one of the important directions of transfusion medicine in 21st century. [37] Due to the unprecedented spread of dangerous blood-borne infections (hepatitis B, C; HIV, etc.), permanent reduction in the number of donors and aging of human population the attention of authorities is greatly attracted to the quality and safety of cryopreserved blood components, as well as its enor-

Отдел криопротекторов, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Department of Cryoprotectants, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-30-07, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта: a.m.kompaniets@gmail.com

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3007, fax: +380 57 373 3084, e-mail: a.m.kompaniets@gmail.com

Поступила 28.08.2012
Принята в печать 30.01.2013

Received August, 28, 2012
Accepted January, 30, 2013

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т. 23, №1. – С. 26–39.
© 2013 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2013. – Vol. 23, Nr. 1. – P. 26–39.
© 2013 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

привлекают качество и безопасность криоконсервированных компонентов крови, огромный потенциал их использования в практической медицине [25, 36].

Возможность эффективного замораживания эритроцитов донорской крови человека с сохранением высокого уровня посттрансфузионной приживаемости *in vivo* (85–90%) впервые была продемонстрирована ещё в 1950 году [1, 6, 25]. Однако на современном этапе криоконсервирование эритроцитов применяется в основном для создания стратегических запасов эритроцитсодержащих компонентов донорской крови, хранения эритроцитов редких групп и аутологичной крови [4, 23, 25] вследствие высокой стоимости криоконсервированных эритроцитов, непродолжительного срока хранения размороженных клеток [1, 41].

Современные технологии криоконсервирования эритроцитов преимущественно основаны на использовании в качестве криопротектора глицерина, главной проблемой применения которого являются трудоемкие и сложные процессы глицеринизации и деглицеринизации (отмывания) клеток после размораживания [1, 7, 36, 38]. И хотя в последние годы достигнут определенный прогресс в автоматизации этих процессов за счет внедрения специального аппарата ACPTM215 («Haemonetics», США) [43], вопросы экономической эффективности и доступности технологий криоконсервирования эритроцитов с глицерином остаются открытыми.

Главным преимуществом методов криоконсервирования эритроцитов с такими непроникающими (экстрацеллюлярными) криопротекторами, как гидроксипропилированный крахмал (ГЭК), поливинилпирролидон (ПВП), полиэтиленоксид (ПЭО), является возможность исключения этапа их отмывания перед трансфузией [3, 35, 41]. Однако по показателям сохранности размороженных клеток эти методы уступают криоконсервированию эритроцитов с глицерином и поэтому широкого признания не получили. К недостаткам экстрацеллюлярных соединений относят возможность значительной (до 50%) дегидратации клеток на этапах криоконсервирования, необратимые изменения (повреждения) мембран эритроцитов после замораживания-отогрева, их низкую осмотическую устойчивость [17, 18, 21, 34, 40], и как следствие – риск развития внутрисосудистого гемолиза перелитых эритроцитов [42]. Имеются данные, что ГЭК и ПВП способны накапливаться в клетках ретикулоэндотелиальной системы реципиента после массивных трансфузий, ПВП может повышать свертываемость крови реципиента, вызывать гранулематозные поражения ткани в местах введения, но глав-

ный потенциал для применения в практической медицине [25, 36].

The possibility for successful freeze-thawing of human RBCs with preserved high post-transfusion grafting *in vivo* (85–90%) was for the first time demonstrated in 1950 [1, 6, 25]. However, nowadays the cryopreservation of RBCs is applied primarily for the creation of strategic stocks of RBC-containing donor blood components, as well as for storage of RBCs of rare blood groups or the autologous blood [4, 23, 25] and this is due to the high cost of cryopreserved RBCs and a short shelf life of thawed cells [1, 41].

Modern technologies for cryopreservation of RBCs are mainly based on the use of glycerol as a cryoprotectant, but the main difficulties in its applications are time-consuming and complex process and glycerolization and deglycerolization (washing) of the cells after thawing [1, 7, 36, 38]. Although recently a progress has been achieved in the automation of these processes through the introduction of a special device ACPTM215 (Haemonetics, USA) [43], the issues of cost-effectiveness and affordability of technologies for cryopreservation of RBCs using glycerol remain open.

The main advantage offered by the methods of RBCs cryopreservation using non-penetrating (extracellular) cryoprotectants, such as hydroxyethyl starch (HES), polyvinylpyrrolidone (PVP), polyethylene oxide (PEO), is the possible exclusion of the washing procedure before transfusion [3, 35, 41]. However, in terms of the survival of thawed cells, these methods yield to cryopreservation of RBCs using glycerol, and therefore have not found the wide acceptance. The disadvantages of extracellular compounds include also the possible significant (up to 50%) dehydration of cells during cryopreservation, irreversible changes (damages) of RBC membranes after freeze-thawing, their low osmotic resistance [17, 18, 21, 34, 40], and as a result these elevate the risk of intravascular hemolysis of transfused red blood cells [42]. There are the reports about possible accumulation of HES and PVP in the cells of the reticuloendothelial system of the recipient after massive transfusions, PVP can increase clotting of recipient's blood, cause granulomatous damage of tissues in the injection site, and, above all, it has a remote carcinogenic effect [22, 41, 42].

It should be noted that recently the experimental studies on the development of RBC cryoprotective solutions based on non-penetrating substances attracted the interest of the researchers [21, 27, 29, 31, 33].

As a promising cryoprotectants with the extracellular mechanism of action one could consider oxyethylated derivatives of alcohols, in particular oxyethylated glycerol oligomers (OEG), synthesized at the Department of Cryoprotectants of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine [16, 24]. Assessment



ное – обладает отдаленным канцерогенным эффектом [22, 41, 42].

Следует отметить, что в последние годы отмечен рост экспериментальных исследований по разработке криоконсервантов для эритроцитов на основе непроникающих соединений [21, 27, 29, 31, 33].

К перспективным криопротекторам с экстрацеллюлярным механизмом действия следует отнести оксиэтильные производные спиртов, в частности олигомеры оксиэтилированного глицерина (ОЭГ), синтезированные в отделе криопротекторов ИПКиК НАН Украины [16, 24]. Исследование фазовых переходов и физических состояний растворов олигомеров ОЭГ показало, что их молекулы характеризуются выраженной способностью к формированию водородных связей с молекулами воды; водные растворы этих соединений демонстрируют высокую склонность к стеклованию, при охлаждении они представляют собой гетерогенные системы, включающие аморфную и кристаллическую фазы, или гомогенные аморфные [10, 11]. Установлена способность ОЭГ_{n=25} и ОЭГ_{n=30} оказывать защитный эффект в условиях развития гипертонического стресса эритроцитов [9]. Показана перспективность использования ОЭГ_{n=25} и ОЭГ_{n=30} в качестве непроникающих криопротекторов для криоконсервирования эритроцитов человека, однако отмечен высокий уровень их осмотической хрупкости после замораживания-отогрева [13, 14, 16, 20].

В последние годы активно разрабатывается новый подход к созданию эффективных криозащитных сред для низкотемпературного консервирования клеток и тканей, в том числе эритроцитов, заключающийся в комбинировании в растворах криопротекторов, отличающихся химической структурой и физико-химическими свойствами, механизмом криозащитного действия [21]. В этой связи целью настоящей работы явилось исследование при замораживании эритроцитов криозащитных свойств растворов на основе непроникающего ОЭГ_{n=25} в комбинации с проникающими криопротекторами.

Материалы и методы

Объектом исследования был эритроконцентрат, выделенный из донорской крови, заготовленной на гемоконсерванте «Глюглицир» и хранившейся после эксфузии не более 2-х суток при 4°C. Эритроконцентрат получали методом центрифугирования цельной крови при 1250 g в течение 20 мин с последующим удалением плазмы и лейкоцитарного слоя.

В качестве криопротекторов использовали ОЭГ_{n=25}, 1,2-пропандиол (1,2-ПД), диметилсульфоксид (ДМСО), диметилацетамид (ДМАц). Все вещества марки «ч. д. а.» или «х. ч.» были допол-

of phase transitions and physical state of the solution of OEG oligomers showed that these molecules were characterized by a significant ability to formation of hydrogen bonds with water molecules; aqueous solutions of these substances exhibit a high tendency to vitrification, during cooling they became heterogeneous systems, with amorphous and crystalline phases, or homogeneous amorphous systems [10, 11]. There was found the ability of OEG_{n=25} and OEG_{n=30} to render a protective effect under development of hypertonic stress in RBCs [9]. The prospects of OEG_{n=25} and OEG_{n=30} as non-penetrating cryoprotectants were shown during cryopreservation of human RBCs, however, a high level of osmotic fragility after freezing and thawing was noted [13, 14, 16, 20].

Recently, a new approach to create effective cryoprotective media for low-temperature preservation of cells and tissues, including RBCs is developed, which consists in combination of cryoprotectants with different chemical structure, physico-chemical properties, and mechanism of protective action [21]. In this context, the aim of this work was to investigate the cryoprotective properties of solutions based on non-penetrating OEG_{n=25} in combination with penetrating cryoprotectants during freeze-thawing of RBCs

Materials and methods

The object under study was erythromass isolated from blood procured in Glugicir solution and stored after procurement not more than 2 days at 4°C. Erythromass was derived by centrifugation of whole blood at 1250g for 20 min, followed by removal of the plasma and leuko-platelet layer.

As cryoprotectants we used OEG_{n=25}, 1,2-propane diol (1,2-PD), dimethyl sulfoxide (DMSO), dimethyl acetamide (DMAc). All the substances were of 'analytical grade' or 'chemically pure' and additionally purified and identified at the Department of Cryoprotectants of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine. Cryoprotectant solutions were prepared on the base of phosphate-buffered saline (51.7 mM NaCl, 9 mM NaH₂PO₄, 0,46 mM Na₂HPO₄, pH 7.4). Concentration of cryoprotectants is hereinafter expressed in percents w/w.

The investigation was directed on assessment of cryoprotective properties of solutions containing different combinations of OEG_{n=25} with 1,2-PD, DMSO and DMAc (in ratios 1:1, 2:1 and 5:1) in total concentration of 30% comparing with 30% OEG_{n=25} solution, which was chosen as the most effective to achieve high post-thaw preservation of RBCs (baseline control). As additional controls served the solutions containing 25, 20 and 15% concentration of OEG_{n=25} without penetrating cryoprotectants.

Samples of RBCs in the cryoprotective media were frozen in 2 ml plastic vials by immersion in liquid nitro-



нительно очищены и идентифицированы в отделе криопротекторов ИПКиК НАН Украины. Растворы криопротекторов готовили на фосфатно-солевом буфере (51,7 мМ NaCl, 9 мМ NaH₂PO₄, 0,46 мМ Na₂HPO₄, pH 7,4). Концентрация криопротекторов далее приводится в массовых процентах.

Исследовали криозащитные свойства растворов, содержащих различные комбинации ОЭГ_{n=25} с 1,2-ПД, ДМСО и ДМАц (соотношение 1:1, 2:1 и 5:1) в суммарной (общей) концентрации 30% по сравнению с 30%-м раствором ОЭГ_{n=25}, которая была выбрана как наиболее эффективная и позволяющая достичь высокого уровня сохранности эритроцитов после замораживания-отогрева (базовый контроль). Дополнительным контролем служили растворы, содержащие 25, 20 и 15%-е концентрации ОЭГ_{n=25} без добавления проникающих криопротекторов.

Образцы эритроцитов в криозащитных средах замораживали в полиэтиленовых ампулах вместимостью 2 мл погружением в жидкий азот, хранили при -196°C от 1 до 3 недель. Образцы отогревали на водяной бане при температуре 40...42°C при постоянном покачивании контейнера.

Сохранность эритроцитов оценивали по следующим показателям: уровень гемолиза, количество свободного гемоглобина в клеточной взвеси, общий гемоглобин клеточной взвеси, величина гематокрита, осмотическая хрупкость эритроцитов в изотоническом и гипотоническом растворах NaCl.

Содержание общего гемоглобина в образце и уровень свободного гемоглобина в клеточной взвеси определяли на фотоколориметре КФК-3-01, используя набор реактивов для диагностики («Felicit», Украина); показатель гематокрита эритроцитов – унифицированным микрометодом [12]; осмотическую хрупкость эритроцитов – стандартным методом [19]. Процент гемолизированных клеток во взвеси рассчитывали по формуле Huggins [30]:

$$H_{\%} = \frac{Hb_{св}}{Hb_{общ}} \times (1 - Ht) \times 100\%,$$

где $Hb_{св}$ – содержание свободного гемоглобина в надосадке, г/л; $Hb_{общ}$ – содержание общего гемоглобина в суспензии эритроцитов; Ht – величина гематокрита, %.

Сохранность эритроцитов, замороженных-отогретых в 30%-м растворе ОЭГ_{n=25} и комбинированном растворе 15% ОЭГ_{n=25} с 15% ДМАц в динамике 48-часового гипотермического хранения, исследовали следующим образом. Размороженную суспензию эритроцитов помещали во взвешивающий плазмозамещающий раствор ЦОЛИПК-8в в соотношении 1:1 (по объему) и хранили при темпе-

ген and stored at -196°C for 1 to 3 weeks. The samples were warmed in a water bath at a temperature of 40...42°C with constant shaking of the container.

Survival of RBCs was evaluated by the following parameters: the level of hemolysis, content of free hemoglobin in the cell suspension, the total hemoglobin content in cell suspension, the value of hematocrit, erythrocyte osmotic fragility in isotonic and hypotonic solutions of NaCl.

The content of total hemoglobin in the sample and of free hemoglobin in cell suspension was determined using photocolorimeter KFK-3-01 (Ukraine) and a kit of diagnostic reagents (Felicit, Ukraine); RBC hematocrit was assessed by the unified micromethod [12], RBC osmotic fragility was found by standard approach [19]. Percentage of hemolyzed cells in suspension was calculated according Huggins formula [30]:

$$H_{\%} = \frac{Hb_{free}}{Hb_{total}} \times (1 - Ht) \times 100\%,$$

where Hb_{free} was the content of free hemoglobin in the supernatant, g/l; Hb_{total} was the content of total hemoglobin in the RBC suspension, g/l; Ht was the hematocrit value, %.

Survival of RBCs, frozen-thawed in 30% solution of OEG_{n=25} and the combined solution of 15% OEG_{n=25} and 15% DMAc during 48 hrs hypothermic storage was examined as follows. The thawed RBC suspension was placed in the plasma substitute solution TsOLIPK-8v in 1:1 ratio (v/v) and stored at $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 48 hrs, the RBCs were assessed in 1, 24 and 48 hrs of storage.

Statistical analysis of the results was performed using the Statistica 6.0 software, statistical significance of the differences between groups was estimated by nonparametric Wilcoxon U-test, considering the differences as significant if significance level was $p < 0.05$ ($n = 6$).

Results and discussion

To modify the cryoprotective solutions based on non-penetrating OEG_{n=25} these were supplemented with penetrating cryoprotectants of diols (1,2-PD), amides (DMAc) or sulfoxides (DMSO) series. Considering the differences in the structure, physical and chemical properties, rate and mechanisms of penetration of these small molecules through the cell membrane, one can assume that the combined cryoprotective medium would have a different impact on the thermodynamic processes occurring in the cell-cryoprotectant system on stages of exposure, freeze-thawing, and further transfer of thawed RBCs in isoosmotic medium.

Level of hemolysis of the RBCs, frozen-thawed in 30 and 25% solutions of OEG_{n=25}, was 1.3 ± 0.32 and

ратуре $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 48 ч; эритроциты исследовали через 1, 24 и 48 ч хранения.

Для статистического анализа результатов использовали программу «Statistica 6.0», для оценки статистической значимости различий между группами применяли непараметрический U-критерий Уилкоксона, считая достоверными различия с уровнем значимости $p < 0,05$ ($n = 6$).

Результаты и обсуждение

Для модификации криозащитных растворов на основе непроницающего ОЭГ_{n=25} в их состав вводили проникающие криопротекторы, относящиеся к ряду диолов (1,2-ПД), амидов (ДМАц) и сульфоксидов (ДМСО). Учитывая различия в структуре, физико-химических свойствах, скорости и механизмах проникновения этих низкомолекулярных соединений через клеточную мембрану, можно предположить, что комбинированные криозащитные среды будут по-разному влиять на термодинамические процессы, протекающие в системе «клетка-криопротектор» на этапах экспозиции, замораживания-отогрева, перенесения деконсервированных эритроцитов в изотоническую среду.

Уровень гемолиза эритроцитов, замороженных-отогретых в 30 и 25%-х растворах ОЭГ_{n=25}, составил $1,3 \pm 0,32$ и $1,4 \pm 0,13\%$ соответственно. Снижение концентрации ОЭГ_{n=25} в криозащитном растворе с 30 до 20 и 15% приводило к существенному увеличению этого показателя. Так, гемолиз эритроцитов, замороженных-отогретых в 20%-м растворе ОЭГ_{n=25}, в 2,5 раза превышал гемолиз клеток, замороженных-отогретых с 30 и 25%-ми растворами ОЭГ_{n=25}, а при использовании 15%-го раствора ОЭГ_{n=25} – более чем в 10 раз (рис. 1).

После замораживания-отогрева эритроцитов в криозащитных растворах, содержащих 25% ОЭГ_{n=25} и 5% 1,2-ПД, ДМСО или ДМАц (соотношение 5:1), достоверных отличий в их сохранности по показателю гемолиза по сравнению с 30 и 25%-ми растворами ОЭГ_{n=25} не выявлено, хотя отмечена тенденция к незначительному его снижению при введении в консервант 5% 1,2-ПД и 5% ДМАц – до $0,9 \pm 0,11$ и $1,1 \pm 0,29\%$ соответственно (рис. 1).

При использовании комбинированных растворов, содержащих 20%-й раствор ОЭГ_{n=25} и 10% 1,2-ПД, ДМСО или ДМАц (соотношение 2:1), достоверно снижался уровень гемолиза по сравнению с раствором, содержащим

$1,4 \pm 0,13\%$ respectively. Reducing the OEG_{n=25} concentration in cryoprotective solution from 30 to 20 and 15% resulted in a significant increase of this index. Hemolysis of frozen-thawed in 20% OEG_{n=25} solution was 2.5 times higher than the index in the cell suspension, frozen-thawed in 30 and 25% solutions of OEG_{n=25}, and in the case of 15% OEG_{n=25} solution it was even more than 10 times higher (Fig. 1).

After freeze-thawing of RBCs in the cryoprotective solution containing 25% OEG_{n=25} and 5% of 1,2-PD, DMSO or DMAc (in 5:1 ratio), no significant differences in their survival in terms of hemolysis index compared to 30 and 25% OEG_{n=25} solutions have been found, although there was a tendency to its slight decrease after the supplementing the solution with 5% 1,2-PD and 5% DMAc – down to $0,9 \pm 0,11$ and $1,1 \pm 0,29\%$, respectively (Fig. 1).

Using the combined solution containing 20% of OEG_{n=25} and 10% of 1,2-PD, DMSO or DMAc (in 2:1 ratio) resulted in a significant reduction of the hemolysis level comparing to a solution containing solely 20% of OEG_{n=25} (Fig. 1). In this case, there was a similar tendency like after supplementing the cryopreservative solution with penetrating cryoprotectants in 5% concentration: the presence in cryopreservative solution of 10% 1,2-PD and DMAc reduced the hemolysis rate from $3,6 \pm 0,86$ down to $1,2 \pm 0,22$ and $1,08 \pm 0,12\%$, respectively.

The rate of hemolysis in RBC suspension, frozen-thawed in 15% OEG_{n=25} solution was the highest

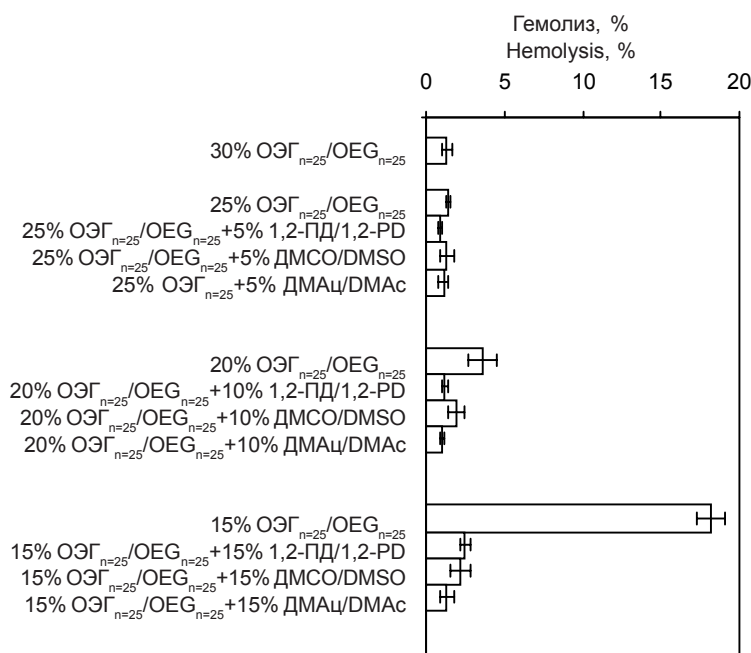


Рис. 1. Гемолиз эритроцитов после замораживания-отогрева в растворах, содержащих комбинации криопротекторов.

Fig. 1. RBCs hemolysis after freeze-thawing in solutions with cryoprotectants.



только 20%-й ОЭГ_{n=25} (рис. 1). При этом наблюдалась такая же тенденция, как и при введении в криоконсервант проникающих криопротекторов в концентрации 5%: наличие в криозащитном растворе 10% 1,2-ПД и ДМАц снижало величину гемолиза с $3,6 \pm 0,86$ до $1,2 \pm 0,22$ и $1,08 \pm 0,12\%$ соответственно.

Уровень гемолиза эритроцитов, замороженных-отогретых с 15% ОЭГ_{n=25}, в данной серии экспериментов был наиболее высоким ($18,2 \pm 0,94\%$). Введение в состав криозащитных сред 15% 1,2-ПД, ДМСО или ДМАц позволило снизить этот показатель более чем в 9 раз (рис.1), а наиболее значительно (до $1,3 \pm 0,45\%$) – при использовании комбинации 15% ОЭГ_{n=25} с 15% ДМАц.

Важным показателем структурной целостности криоконсервированных эритроцитов, а также их пригодности для клинического использования является количество свободного гемоглобина в клеточной взвеси. В соответствии с существующими стандартами качества гемотранфузионных сред количество свободного гемоглобина во взвеси не должно превышать 0,2 г на дозу эритроцитов или 1,2 г/л [1, 26].

Количество свободного гемоглобина во взвеси эритроцитов, криоконсервированных в базовом 30%-м растворе ОЭГ_{n=25}, составило $0,96 \pm 0,52$ г/л ($M \pm S$). Снижение концентрации ОЭГ_{n=25} в криозащитных растворах до 25, 20 и 15% приводило к повышению уровня свободного гемоглобина во взвеси размороженных клеток до $1,4 \pm 0,28$; $5,0 \pm 0,91$ и $17,8 \pm 0,9$ г/л соответственно. После замораживания-отогрева эритроцитов в комбинированных криозащитных средах, содержащих ОЭГ_{n=25} и 1,2-ПД, ДМСО или ДМАц в соотношении 5:1, отмечено незначительное увеличение уровня свободного гемоглобина во взвеси по сравнению как с 25%-м, так и с 30%-м ОЭГ_{n=25} (рис. 2). Комбинация криопротекторов в растворе в соотношении 2:1 и 1:1 способствовала снижению уровня свободного гемоглобина в клеточной взвеси по сравнению с 20 и 15%-ми растворами ОЭГ_{n=25}, а наиболее значительно (до $1,25 \pm 0,82$ г/л) – при замораживании эритроцитов в растворе, содержащем 20% ОЭГ_{n=25} и 10% ДМАц. Однако достичь уровня контроля (30%-й раствор ОЭГ_{n=25}) по данному показателю не удалось: содержание свободного гемоглобина во взвеси эритроцитов после замораживания в комбинированных криозащитных средах было

($18,2 \pm 0,94\%$) in this series of experiments. Supplementation of cryopreservative with 15% of 1,2-PD, DMSO or DMAc has reduced the index more than 9 times (Fig. 1), and most significantly (down to $1.3 \pm 0.45\%$) in the case of combination of 15% OEG_{n=25} and 15% DMAc.

An important indicator of the structural integrity of cryopreserved RBCs, as well as their fitness for clinical purposes is the amount of free hemoglobin in the cell suspension. In accordance with the existing quality standards for blood transfusion media the amount of free hemoglobin in the suspension shall not exceed 0.2 g per dose of RBCs, or 1.2 g per liter [1, 26].

The amount of free hemoglobin in the RBC suspension, cryopreserved in a basic 30% OEG_{n=25} solution, was 0.96 ± 0.52 g/l ($M \pm S$). Reducing the concentration of OEG_{n=25} in cryoprotective solutions down to 25, 20 and 15% resulted in increased content of free hemoglobin in the suspension of thawed cells up to 1.4 ± 0.28 ; 5.0 ± 0.91 and 17.8 ± 0.9 g/l, respectively. After freeze-thawing of RBCs in combined cryoprotective media containing OEG_{n=25} and 1,2-PD, DMSO or DMAc in 5:1 ratio, a slight increase in the level of free hemoglobin in the suspension was noted comparing to both 25% and 30% OEG_{n=25} solutions (Fig. 2). The combination of cryoprotectants in the solution in 2:1 and 1:1 ratios has reduced the level of free hemoglobin in the cell suspension, compared to 20 and 15% OEG_{n=25} solution, and the most

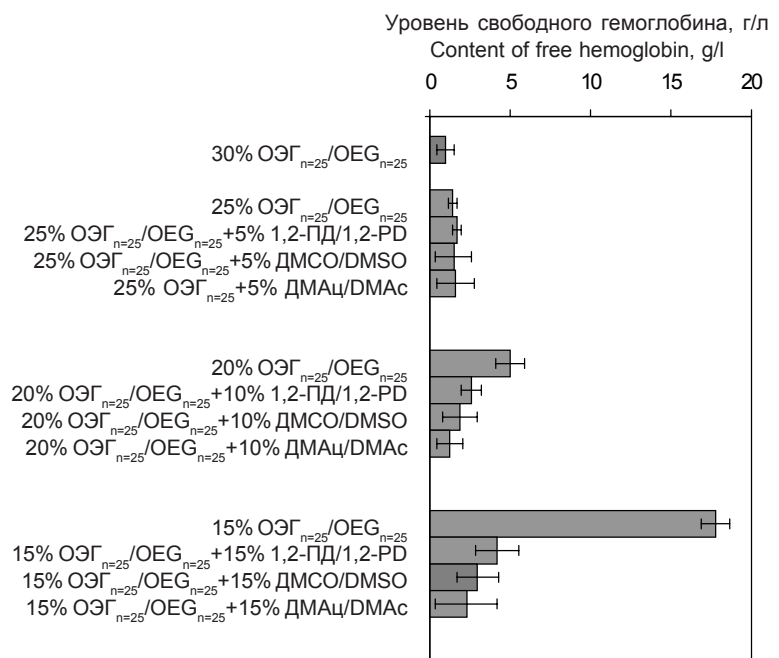


Рис. 2. Свободный гемоглобин в надосадке после замораживания-отогрева эритроцитов в растворах, содержащих комбинации криопротекторов.

Fig. 2. Free hemoglobin content in supernatant after freeze-thawing of RBCs in solutions with cryoprotectants.

более высоким, особенно при соотношении криопротекторов 1:1 (рис. 2).

Криоконсервирование эритроцитов в комбинированных криозащитных растворах приводило к увеличению показателя гематокрита после замораживания-отогрева по сравнению с растворами, содержащими 30, 25, 20 и 15%-е концентрации ОЭГ_{n=25}, что косвенно свидетельствует об уменьшении степени дегидратации (обезвоживания) клеток (рис. 3). Существенной зависимости величины этого показателя от состава криозащитных сред, а также корреляции между его величиной и показателями сохранности криоконсервированных эритроцитов установлено не было.

Информативным критерием целостности мембраны эритроцитов является показатель осмотической хрупкости. После замораживания-отогрева эритроцитов в 30%-м растворе ОЭГ_{n=25} их осмотическая хрупкость в 0,6 и 0,9%-х растворах NaCl составила $11,7 \pm 2,57$ и $10,5 \pm 1,9\%$ соответственно. Однако по мере снижения концентрации ОЭГ_{n=25} до 25; 20 и 15% величина осмотической хрупкости размороженных эритроцитов возрастала, превысив показатели для базового контроля более чем в 2,5–5 раз (рис. 4).

При использовании комбинированных криозащитных сред получены неоднозначные результаты. Так, сочетание 25%-го ОЭГ_{n=25} с 5%-м 1,2-ПД, ДМСО или ДМАц (соотношение 5:1) способствовало достоверному снижению осмотической хрупкости размороженных эритроцитов по сравнению с 25%-м ОЭГ_{n=25} (рис. 4). После замораживания-отогрева эритроцитов в средах, содержащих комбинацию ОЭГ_{n=25} с 1,2-ПД или ДМСО в соотношении 2:1 или 1:1, отмечено резкое увеличение их осмотической хрупкости в 0,6 и 0,9%-х растворах NaCl по сравнению как с соответствующими контролями, так и с 30% ОЭГ_{n=25} (рис. 5). И лишь использование в составе криозащитных растворов комбинации ОЭГ_{n=25} и ДМАц (соотношение 2:1 и 1:1) позволило значительно увеличить сохранность эритроцитов: показатели осмотической хрупкости эритроцитов, криоконсервированных в среде с 20% ОЭГ_{n=25} и 10% ДМАц, составили $10,2 \pm 0,98$ и $8,9 \pm 0,83\%$ для 0,6 и 0,9%-х растворов NaCl соответственно. Однако наиболее устойчивыми к осмотическим воздействиям оказались эритроциты, криоконсервированные в растворе, содержащем 15% ОЭГ_{n=25} и 15% ДМАц. Осмотическая хрупкость этих эритроцитов в 0,9 и 0,6%-х растворах NaCl

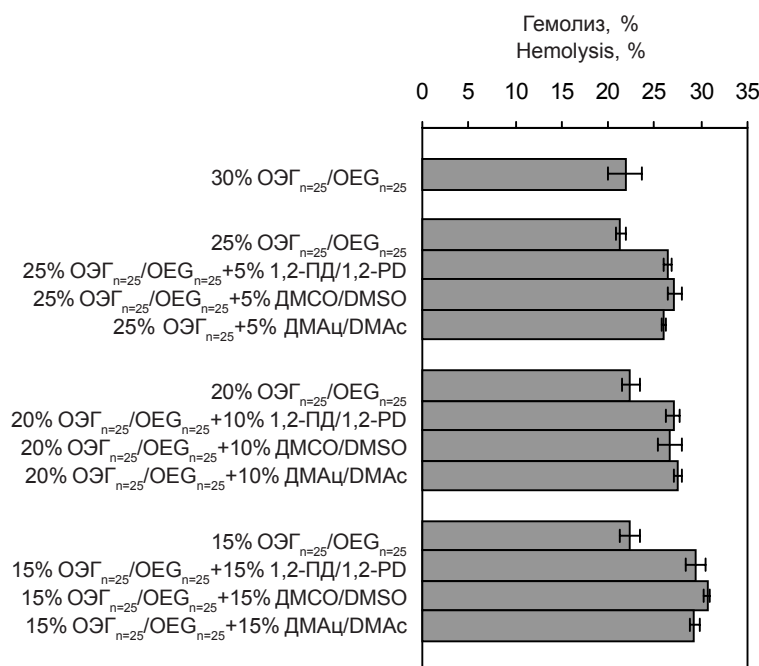


Рис. 3. Показатель гематокрита эритроцитов после замораживания-отогрева в растворах, содержащих комбинации криопротекторов (данные представлены до удаления криопротекторов).

Fig. 3. RBCs hematocrit after freeze-thawing in solutions with cryoprotectants (data were obtained before cryoprotectant removal).

significantly (down to 1.25 ± 0.82 g/l) after freeze-thawing of RBCs in a solution contained 20% OEG_{n=25} and 10% DMAc. However, the control level (30% OEG_{n=25} solution) in terms of this index was not achieved: the content of free hemoglobin in RBC suspension after freeze-thawing in combined cryoprotective media was higher, especially in the case of 1:1 cryoprotectant mixtures (Fig. 2).

Cryopreservation of RBCs in combined cryoprotective solution resulted in an increase in hematocrit after freeze-thawing, compared with solutions containing 30, 25, 20 and 15% concentration of OEG_{n=25}, which indirectly indicated a decrease in the degree of cell dehydration (Fig. 3). No strong relationship of this parameter and the composition of cryoprotective media, as well as no correlation between its level and survival of frozen-thawed RBCs has been established.

An informative measure of RBC membrane integrity is an osmotic fragility index. After freeze-thawing of RBCs in 30% solution OEG_{n=25} their osmotic fragility in 0.6 and 0.9% NaCl solution was $11,7 \pm 2,57$ and $10,5 \pm 1,9\%$, respectively. However, with the reduction of OEG_{n=25} concentration down to 25, 20 and 15% the the osmotic fragility of frozen-thawed RBCs increased, exceeding the basic control more than 2.5–5 times (Fig. 4).

Some ambiguous results were obtained during investigation of combined cryoprotective media. For exam-



была самой низкой и составила $3,6 \pm 0,23$ и $4,1 \pm 0,18\%$ соответственно, т. е. использование комбинации ОЭГ_{n=25} и ДМАц (соотношение 1:1) способствовало снижению осмотической хрупкости размороженных эритроцитов более чем в 10 раз по сравнению с 15%-м раствором ОЭГ_{n=25} и более чем в 3 раза – по сравнению с 30%-м раствором ОЭГ_{n=25}.

При сравнительном изучении осмотической хрупкости криоконсервированных эритроцитов в гипотонических растворах NaCl (рис. 5) установлено, что в 0,5–0,1%-х растворах NaCl величины этого показателя были несколько выше у эритроцитов, замороженных в 30%-м растворе ОЭГ_{n=25}, тогда как в 0,7 и 0,9%-х растворах NaCl более устойчивыми оказались эритроциты, замороженные с комбинированным раствором, содержащим 15% ОЭГ_{n=25} и 15% ДМАц.

Известно, что ДМАц характеризуется наиболее высокой способностью к гидрофобным взаимодействиям по сравнению с 1,2-ПД и ДМСО [8]. По-видимому, положительное влияние ДМАц в составе комбинированных криозащитных сред на осмотическую устойчивость эритроцитов связано с его способностью взаимодействовать с липидными компонентами мембран, в результате чего площадь поверхности плазматической мембраны может увеличиваться, а соотношение объем клетки/площадь поверхности мембраны уменьшаться, что снижает опасность развития коллоидно-осмотического лизиса.

Введение в криозащитные среды на основе ОЭГ_{n=25} низкомолекулярных 1,2-ПД или ДМСО в 10 или 15%-й концентрации вызывало резкое увеличение осмотической хрупкости размороженных эритроцитов. Вероятно, данный эффект может быть следствием как прямого воздействия химических веществ, в частности ДМСО, на клеточную мембрану (токсичность), так и результатом осмотических эффектов комбинированных растворов. Ранее было показано [28, 39], что повреждающее действие ДМСО в процессе замораживания-отогрева может быть обусловлено деструктуризацией липидного бислоя за счет гидрофобных взаимодействий метильной группы ДМСО с углеводными компонентами фосфолипидов. Так, ДМСО в концентрациях от 2,5 до 7,5 моль% вызывает истончение мембраны и увеличивает текучесть её гидрофобных компонентов [28]; повыше-

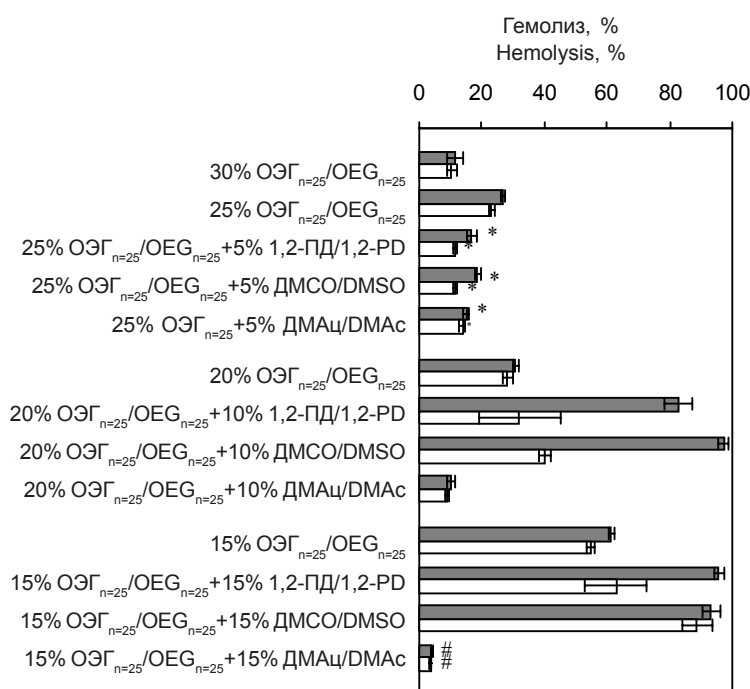


Рис. 4. Осмотическая хрупкость эритроцитов после замораживания-отогрева в растворах, содержащих комбинации криопротекторов (■ – 0,6% раствор NaCl, □ – 0,9% NaCl; * # – отличия статистически достоверны по сравнению с 25 и 30% ОЭГ_{n=25} соответственно, $p \leq 0,05$).

Fig. 4. RBCs osmotic fragility after freeze-thawing in solutions with cryoprotectants (■ – 0.6% NaCl solution; □ – 0.9% NaCl solution; * # – the differences are statistically significant comparing to 25 and 30% OEG_{n=25} solutions, respectively, $p \leq 0.05$)

le, the combination of 25% ОЭГ_{n=25} with a 5% 1,2-PD, DMSO or DMAc (in 5:1 ratio) contributed to a significant reduction of osmotic fragility of frozen-thawed erythrocytes if compared with 25% ОЭГ_{n=25} (Fig. 4). After freeze-thawing of RBCs in the media containing a combination of ОЭГ_{n=25} with 1,2-PD or DMSO in a ratio of 2:1 or 1:1, there was a sharp increase in their osmotic fragility in 0.6 and 0.9% NaCl solutions if compared with appropriate controls, as well as with 30% ОЭГ_{n=25} (Fig. 5). Only in the case of cryoprotective solution with combination of ОЭГ_{n=25} and DMAc (2:1 and 1:1 ratios) the RBC survival increased significantly: osmotic fragility of RBCs frozen-thawed in the medium with 20% ОЭГ_{n=25} and 10% DMAc was 10.2 ± 0.98 and $8.9 \pm 0.83\%$ in 0.6 and 0.9% NaCl solutions, respectively. However, the most resistant to osmotic effects were the RBCs frozen-thawed in the solution contained 15% ОЭГ_{n=25} and 15% DMAc. The osmotic fragility of these cells in 0.9 and 0.6% NaCl solutions was the lowest and made 3.6 ± 0.23 and $4.1 \pm 0.18\%$ respectively, i. e. using a combination of ОЭГ_{n=25} and DMAc (in 1:1 ratio) has reduced the osmotic fragility of frozen-thawed RBCs more than 10 times if compared with 15% ОЭГ_{n=25} solution and more than 3 times if compared with ОЭГ_{n=25} 30% solution.

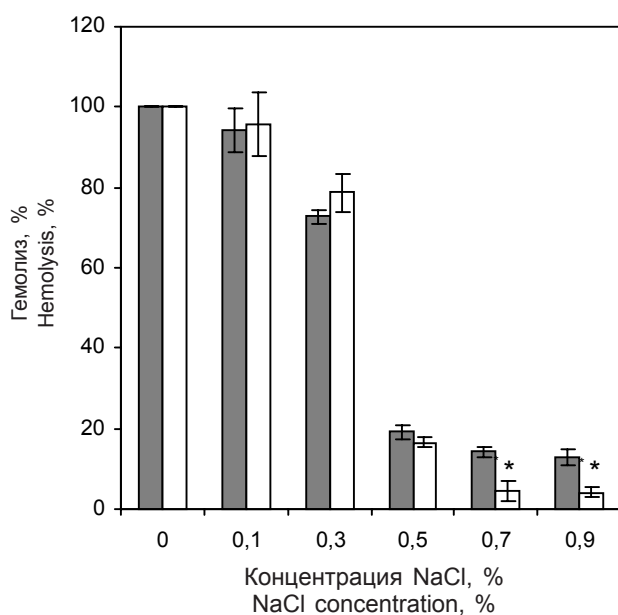


Рис. 5. Осмотическая хрупкость эритроцитов в гипотонических растворах NaCl: ■ – 30% ОЭГ_{n=25}; □ – 15% ОЭГ_{n=25} + 15% ДМАц (* – отличия статистически достоверны по сравнению с 30% ОЭГ_{n=25}, $p \leq 0,05$).

Fig. 5. RBCs osmotic fragility in hypotonic NaCl solutions: ■ – 30% OEG_{n=25}; □ – 15% OEG_{n=25} + 15% DMAc; *# – the differences are statistically significant comparing to 30% OEG_{n=25} solution, $p \leq 0.05$

ние концентрации ДМСО до 10–20 моль% способно инициировать образование транзиторных водных пор в мембранах; дальнейшее повышение концентрации (30 моль% и более) приводит к структурной дезинтеграции бислоя [28, 39].

Отсутствие эффекта от использования в комбинированных растворах 10 и 15%-х концентраций 1,2-ПД может объясняться тем, что этот криопротектор снижает вязкость фосфолипидного бислоя мембран эритроцитов и индуцирует дезагрегацию их белковых комплексов, что также может приводить к нарушению структуры эритроцитарных мембран [15].

Если оценивать эффективность использования ДМСО, 1,2-ПД или ДМАц в комбинации с ОЭГ_{n=25} с точки зрения их положительного влияния на сохранность замороженных-отогретых эритроцитов по показателям осмотической хрупкости, то наиболее эффективным криопротектором в составе комбинированного криоконсерванта является ДМАц в концентрации 10 или 15%. Эти данные представляют особый интерес, так как впервые удалось значительно снизить осмотическую хрупкость эритроцитов, замороженных в криозащитной среде с непроникающим полимерным криопротектором ОЭГ_{n=25}. Можно предположить, что отсутствие значимых отличий в сохранности замороженных эритроцитов по показателям гемолита и свободного гемоглобина между комбинированными средами и 30%-м ОЭГ_{n=25} обусловлено высокой криозащитной активностью базового раствора непроникающего криопротектора.

Известно, что эритроциты, криоконсервированные под защитой непроникающих криопротекторов, характеризуются достаточно высоким уровнем

Comparison of osmotic fragility of RBCs frozen-thawed in hypotonic solutions NaCl (Fig. 5) revealed that in the 0.5–0.1% NaCl solutions the values of this index were slightly higher in RBCs, frozen-thawed in 30% OEG_{n=25} solution, whereas in 0.7 and 0.9% NaCl solutions more resistant were the RBCs, frozen-thawed in a combined solution contained 15% OEG_{n=25} and 15% DMAc.

It is known that DMAc has the highest potential for hydrophobic interactions, if compared with 1,2-PD and DMSO [8]. Positive effect of DMAc as a component of combined cryoprotective media on RBC osmotic stability is apparently associated with its ability to interact with lipid components of membranes, resulting in the increased plasma membrane surface and the decreased cell volume-to-surface ratio, which reduces the risk of colloid osmotic lysis.

Introduction to the cryoprotective medium based on OEG_{n=25} of low molecular weight 1,2-PD or DMSO at 10 or 15% concentration caused a sharp increase in osmotic fragility of thawed RBCs. Probably, this effect may be due to both direct effects of the substances, DMSO in particular, on the cell membrane (toxicity), and the result of the osmotic effects caused by combined solutions. It was previously shown [28, 39], that the damaging effect of DMSO during freeze-thawing could be caused by affecting the lipid bilayer structure due to hydrophobic interactions of the methyl group of DMSO with carbohydrate components of phospholipids. For example, DMSO at a concentration of 2.5 to 7.5 mol% caused a thinning of membrane and increased the fluidity of its hydrophobic components [28], increasing the concentration of DMSO up to 10–20 mol% could initiate the formation of transient water pores in membranes, further increasing the concentration (30 mol% or higher) caused the structural disintegration of the bilayer [28, 39].

Lack of positive effect after supplementation of the combined solution with 10 or 15% 1,2-PD may be due to the fact that this cryoprotectant reduces the viscosity of the phospholipid bilayer of RBC membranes and induces disaggregation of protein complexes, which can also lead to impairment of the RBC membrane structure [15].

Evaluation of the efficiency of utilization of DMSO, 1,2-PD or DMAc combined with OEG_{n=25} in terms of



показателей сохранности сразу после отогрева [2, 17, 35]. Вместе с тем криоконсервирование эритроцитов в растворах непроницающих криопротекторов может приводить к развитию латентных повреждений их мембран, которые проявляются, прежде всего, в нарушении липидной асимметрии и модификации цитоскелет-мембранного комплекса клеток [5, 34]. До настоящего времени возможные пути предотвращения латентных повреждений исследованы недостаточно. По мнению D. V. Pribor [32] латентные повреждения эритроцитов после отогрева обнаруживаются не сразу, а проявляются лишь в снижении их осмотической устойчивости и нарастании гемолиза в процессе последующего гипотермического хранения.

Принимая во внимание этот факт, мы исследовали сохранность эритроцитов, криоконсервированных в 30%-м растворе ОЭГ_{n=25} и комбинированном растворе 15% ОЭГ_{n=25} с 15% ДМАц и взвешенных после отогрева в плазмозамещающем растворе ЦОЛИПК-8в, в процессе их гипотермического хранения при $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 1, 24 и 48 ч.

Более высокий уровень сохранности криоконсервированных эритроцитов по показателю их осмотической хрупкости в 0,6 и 0,9%-х растворах NaCl в течение 48-часового гипотермического хранения установлен для криозащитной среды, содержащей комбинацию 15% ОЭГ_{n=25} и 15% ДМАц, однако показатели гемолиза и содержание свободного гемоглобина были значительно ниже в образцах, криоконсервированных в 30%-м растворе ОЭГ_{n=25} (таблица).

Следует особо подчеркнуть, что после 24 ч гипотермического хранения в растворе ЦОЛИПК-8в содержание свободного гемоглобина во взвеси клеток, замороженных-отогретых в 30%-м ОЭГ_{n=25}, соответствовало стандартам, установленным для криоконсервированных эритроцитов, предназначенных для трансфузий [1, 26]. После 48 ч гипотермического хранения эритроцитов, криоконсервированных как в 30%-м ОЭГ_{n=25}, так и 15%-м ОЭГ_{n=25} с 15% ДМАц, содержание свободного гемоглобина во взвеси увеличивалось, а показатели гемолиза, осмотической хрупкости и гематокрита снижались.

Приведенные данные отчасти подтверждают гипотезу Ф.Р. Виноград-Финкель [6] о наличии скрытых повреждений мембраны лишь в небольшой фракции эритроцитов из общей их популяции. Увеличение уровня свободного гемоглобина во взвеси на фоне снижения показателя гематокрита, а также снижение показателей гемолиза и осмотической хрупкости эритроцитов после 48 ч гипотермического хранения могут свидетельствовать о том, что часть фракции поврежденных эритроцитов лизировала, а оставшиеся клетки имели большую осмотическую устойчивость.

their positive impact on the survival of frozen-thawed erythrocyte by osmotic fragility indices, indicated DMAc in 10 or 15% concentration to be the most effective cryoprotectant in the combined cryoprotectant medium. These data are of particular interest because it was the first successful attempt to significantly reduce the osmotic fragility of RBCs, frozen-thawed in cryoprotective medium with non-penetrative polymeric cryoprotectant OEG_{n=25}. One could assume that the absence of significant differences in the survival of frozen-thawed RBCs in terms of hemolysis and free hemoglobin indices between the combined media and 30% OEG_{n=25} solution was due to high cryoprotective activity of basic solution of non-penetrating cryoprotectant.

It is known that RBCs frozen-thawed under the protection of non-penetrating cryoprotectants, are characterized by rather high survival immediately after thawing [2, 17, 35]. However, freeze-thawing of RBCs in non-penetrating cryoprotectants solutions could lead to the development of latent damages in the membranes, primarily, in the lipid asymmetry derangements and modified cytoskeleton-membrane complex of the cells [5, 34]. To date, the possible ways to prevent latent damages have been poorly investigated. According to Pribor [32], latent post-thaw damages in RBCs could not be detected immediately, but appear only as reduced osmotic stability and increasing hemolysis during subsequent hypothermic storage.

Taking this into account, we investigated the survival of RBCs, frozen-thawed in 30% OEG_{n=25} solution and combined solution of 15% OEG_{n=25} and 15% DMAc, suspended after thawing in plasma-substitute TsOLIPK-8v, and stored at $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ for 1, 24 and 48 hrs.

Higher level of frozen-thawed RBCs survival in terms their osmotic fragility in 0.6 and 0.9% NaCl solutions during 48-hour hypothermic storage was found for the case of cryoprotective medium contained a combination of 15% OEG_{n=25} and 15% DMAc, however, the indices of hemolysis and free hemoglobin content were significantly lower in the samples frozen-thawed in 30% OEG_{n=25} solution (Table).

It should be emphasized that after 24 hours of hypothermic storage in TsOLIPK-8c solution the content of free hemoglobin in the suspension of cells, frozen-thawed in 30% OEG_{n=25} solution conformed to the standards set for cryopreserved RBCs intended for transfusion [1, 26]. After 48 hrs of hypothermic storage of RBCs, frozen-thawed in both 30% OEG_{n=25} and 15% OEG_{n=25} with 15% DMAc solutions the content of free hemoglobin in the suspension increased, and rates of hemolysis, osmotic fragility and hematocrit decreased.

The above data partly support the hypothesis of Vinograd-Finkel [6] about occurrence of latent damages



Сохранность размороженных эритроцитов, криоконсервированных в 30%-м растворе ОЭГ_{n=25} и 15%-м ОЭГ_{n=25} с 15% ДМАц, в процессе гипотермического хранения в среде ЦОЛИПК-8в при температуре $4 \pm 2^\circ\text{C}$ ($M \pm S$; $n = 5$)
Survival of RBCs during hypothermic storage at $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ in COLIPK-8v medium after freeze-thawing in 30% OEG_{n=25} solution, and 15% OEG_{n=25} with 15% DMAc solution ($M \pm S$; $n = 5$)

Длительность хранения, ч Storage duration, hrs	Исследуемый раствор Studied solution	Осмотическая хрупкость, % Osmotic fragility, %		Гемолиз, % Hemolysis, %	Гемолиз, % Free hemoglobin, g/l	Гематокрит, % Hematocrit, %
		0,6% NaCl	0,9% NaCl			
1	30% ОЭГ _{n=25} /ОЭГ _{n=25}	4,5 ± 0,55	1,8 ± 0,26	1,6 ± 0,32	0,83 ± 0,2	28,6 ± 0,63
	15% ОЭГ _{n=25} /ОЭГ _{n=25} + 15% ДМАц/DMAc	1,8 ± 0,26*	0,7 ± 0,25*	5,2 ± 1,1*	2,3 ± 0,76*	27,7 ± 0,4
24	30% ОЭГ _{n=25} /ОЭГ _{n=25}	6,9 ± 0,25	7,22 ± 0,59	1,8 ± 0,28	0,87 ± 0,19	28,2 ± 0,51
	15% ОЭГ _{n=25} /ОЭГ _{n=25} + 15% ДМАц/DMAc	4,7 ± 1,15*	1,5 ± 0,6*	5,3 ± 1,88*	2,5 ± 0,64*	27,9 ± 1,11
48	30% ОЭГ _{n=25} /ОЭГ _{n=25}	5,35 ± 0,5	6 ± 0,08	1,2 ± 0,53	1,8 ± 0,23	23,2 ± 0,98
	15% ОЭГ _{n=25} /ОЭГ _{n=25} + 15% ДМАц/DMAc	1,1 ± 0,27*	1,1 ± 0,39*	1,8 ± 0,62	2,87 ± 0,25	25,9 ± 1,3

Примечание: * – отличия статистически достоверны по сравнению с 30%-м раствором ОЭГ_{n=25}, $p \leq 0,05$.

Note: * – the differences are statistically significant if compared with 30% OEG_{n=25} solution, $p \leq 0.05$.

Выводы

Результаты проведенных исследований показали высокую криозащитную активность экстрацеллюлярного криопротектора ОЭГ_{n=25} при замораживании эритроцитов донорской крови человека.

Введение в состав криозащитных растворов на основе ОЭГ_{n=25} проникающих криопротекторов 1,2-ПД, ДМСО или ДМАц в соотношении 5:1, а также ДМАц в соотношении 2:1 и 1:1 способствовало уменьшению осмотической хрупкости размороженных эритроцитов. Наиболее высокий уровень осмотической устойчивости криоконсервированных эритроцитов получен при использовании раствора, содержащего ОЭГ_{n=25} и ДМАц в соотношении 1:1. Таким образом, впервые при замораживании эритроцитов в криоконсерванте на основе полимерного экстрацеллюлярного криопротектора ОЭГ_{n=25} удалось значительно снизить их осмотическую хрупкость.

По результатам экспериментов по 48-часовому гипотермическому хранению эритроцитов, криоконсервированных с ОЭГ_{n=25} в составе комбинированного или однокомпонентного раствора и взвешенных после отогрева в плазмозамещающем растворе ЦОЛИПК-8в, установлены отсутствие существенных потерь клеток (показатель гематокрита), а также значительного увеличения показателей гемолиза, свободного гемоглобина и осмотической хрупкости. Полученные данные можно трактовать как подтверждение целесообразности применения в качестве непроникающего криопротектора для замораживания эритроцитов ОЭГ_{n=25}, а также необходимости дальнейших исследований по созданию комбинированных криоконсервантов на его основе.

of the membrane in only a small fraction of total RBC population. Increasing levels of free hemoglobin in the suspension on the background of decreased hematocrit as well as the reduced hemolysis and osmotic fragility of RBCs after 48 hrs of hypothermic storage may indicate that some fraction of damaged red blood cells were lysed, and the remaining cells had a greater osmotic stability.

Conclusion

The results of the conducted research have shown a high cryoprotective activity of extracellular cryoprotectant OEG_{n=25} during freeze-thawing of human RBCs.

The supplementing of cryoprotective solutions based on OEG_{n=25} with penetrating cryoprotectants 1,2-PD, DMSO or DMAc in 5:1 ratio, as well as with DMAc in 2:1 and 1:1 ratios allowed to reduce the osmotic fragility of frozen-thawed RBCs. The highest level of osmotic stability of frozen-thawed RBCs was obtained in case of solution contained OEG_{n=25} and DMAc in 1:1 ratio. Thus, for the first time we succeeded to reduce significantly the osmotic fragility of RBCs after the freeze-thawing of the cells in the solution based on extracellular polymeric cryoprotectant OEG_{n=25}.

Hypothermic storage during 48 hrs of RBCs frozen-thawed in OEG_{n=25} solution combined with other cryoprotectants or as single cryoprotectant and suspended after thawing in plasma-substitute solution TsOLIPK-8c resulted in insignificant loss of cells (in terms of hematocrit index), as well as no significant increase in indices of hemolysis, free hemoglobin content and osmotic fragility were found. These data



Литература

1. Аграненко В.А., Федорова Л.И. Замороженная кровь и ее клиническое применение. – М.: Медицина, 1983. – 96 с.
 2. Бабийчук Л.А. Конформационные изменения эритроцитов под влиянием криопротектора ПЭО-1500 // Проблемы криобиологии. – 1997. – № 1–2. – С. 95–99.
 3. Бабийчук Л.А., Землянских Н.Г. Оптимизация и преимущества безотмывочного метода криоконсервирования эритроцитов с ПЭО–1500 // Проблемы криобиологии. – 2001. – №1. – С. 35–41.
 4. Багаутдинов Ш.М. Совершенствование методов долгосрочного хранения крови и костного мозга в замороженном состоянии в службе крови Вооруженных Сил: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. – СПб, 2000. – 31 с.
 5. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. – Киев: Наук. думка, 1982. – 255 с.
 6. Виноград-Финкель Ф.Р., Леонтович В.А. Теоретические проблемы криоконсервированных клеток крови // Проблемы гематологии и переливания крови. – 1977. – Т. 22, №2. – С.3–9.
 7. Виноград-Финкель Ф.Р., Федорова Л.И., Семенова Н.В. Полноценность эритроцитов, хранившихся 12–16 лет при -196°C // Проблемы гематологии и переливания крови. – 1980. – Т. 25, №1. – С. 8–11.
 8. Гордієнко О.І., Гордієнко Є.О., Ліннік Т.П., Компанієць А.М. Механізми проникання криопротекторів крізь мембрани еритроцитів // Проблемы криобиологии. – 2002. – №4. – С. 9–15.
 9. Есипова Ю.С., Николенко А.В., Чеканова В.В., Компанієць А.М. Влияние оксизтилированных производных глицерина на устойчивость эритроцитов к действию гипертонического стресса // Материалы VII Международной научно-технической конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ». – 2011. – С. 76–77.
 10. Животова Е.Н., Зинченко А.В., Чеканова В.В., Компанієць А.М. Термический анализ бинарных систем вода – оксизтилированный глицерин (степень полимеризации $n = 5$ и 25) при температурах ниже 273 K // Доп. НАН України. – 2006. – №9. – С. 74–79.
 11. Животова Е.Н., Кулешова Л.Г., Зинченко А.В., Чеканова В.В. Исследование физических состояний бинарных систем вода – оксизтилированный глицерин со степенью полимеризации $n = 5$ и 25 при температурах ниже 273 K методом криомикроскопии // Доп. НАН України. – 2007. – №4. – С. 78–84.
 12. Козлов А.А., Простакова Т.М., Берковский А.Л. Пособие для врачей-лаборантов по методу определения гемоглобина. – М.: НПО «Ренам», 2006. – 26 с.
 13. Компанієць А.М., Николенко А.В., Чеканова В.В., Троц Ю.П. Криоконсервирование эритроцитов под защитой олигомера оксизтилированного глицерина // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т. 15, №3. – С. 561–565.
 14. Компанієць А.М., Ніколенко О.В., Чеканова В.В., Єсіпова Ю.С. Кріозахисна ефективність середовищ на основі оксизтильних похідних поліолів при заморожуванні еритроцитів людини // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, №3. – С. 299–301.
 15. Лоевский М.М. Влияние глицерина (пропантриола) и 1,2-пропандиола на структурно-функциональные характеристики криоконсервированных эритроцитов : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1984. – 21 с.
 16. Лубяный В.Г., Бредихина Л.П., Шраго М.И. Криопротекторная активность олигомеров ОЭГ в низкотемпературном консервировании эритроцитов // Криобиология и криомедицина. – 1981. – Вып. 8. – С. 34–40.
 17. Мартыненко А.А., Луговой В.И. Влияние ПЭО-1500 и низких температур на изотермическую резистентность эритроцитов человека // Криобиология и криомедицина. – 1989. – Вып. 8. – С. 13–16.
- can be interpreted as an approval of $\text{OEG}_{n=25}$ as the prospective non-penetrating cryoprotectant for freeze-thawing of RBCs, and that further research on the creation of combined cryopreservatives on its base is essential.

References

1. Agranenko V.A., Fedorova L.I. Frozen blood and its clinical application. – M.: Medicine, 1983. – 96 p.
2. Babijchuk L.A. Conformational changes in erythrocytes under the effect of PEO–1500 cryoprotectant // Problems of Cryobiology. – 1997. – N1–2. – P. 95–99.
3. Babijchuk L.A., Zemlyanskikh N.G. Optimization and advantages of washing-out method for erythrocytes cryopreservation with PEO-1500 // Problems of Cryobiology. – 2001. – N1. – P. 35–41.
4. Bagautdinov S.M. Improving of long-term storage of blood and bone marrow in a frozen state in Blood transfusion services of the Armed Forces: Author's abstract of thesis ... Doctor of Biol. Sciences. – St. Petersburg, 2000. – 31 p.
5. Belous A.M., Bondarenko V.A. Structural changes in biological membranes during cooling. – Kiev: Nauk. Dumka, 1982. – 255 p.
6. Vinograd-Finkel F.R., Leontovich V.A. Theoretical problems of cryopreserved blood cells // Problemy Gematologii i Perelivaniya Krovi. – 1977. – Vol. 22, N2. – P. 3–9.
7. Vinograd-Finkel F.R., Fedorova L.I., Semenova N.V. Valiability of red blood cells, stored during 12–16 years at -196°C // Problemy Gematologii i Perelivaniya Krovi. – 1980. – Vol. 25, N1. – P. 8–11.
8. Gordienko O.I., Gordienko E.A., Linnik T.P., Kompaniets A.M. Mechanisms of cryoprotectant permeation via erythrocytes membranes // Problems of Cryobiology. – 2002. – N4. – P. 9–15.
9. Yesipova Yu.S., Nikolenko A.V., Chekanova V.V., Kompaniets A.M. Influence of ethoxylated derivatives of glycerol on the stability of red blood cells to the action of hypertonic stress // Proceedings of the VII International Scientific and Technical Conference 'Actual Problems of Biological Physics and Chemistry. BFFH'. – 2011. – P. 76–77.
10. Zhivotova E.N., Zinchenko A.V., Chekanova V.V., Kompaniets A.M. Thermal analysis of binary systems of water – ethoxylated glycerol (degree of polymerization $n = 5$ and 25) at temperatures below 273 K // Dopovidi of National Academy of Sciences of Ukraine. – 2006. – N9. – P. 74–79.
11. Zhivotova E.N., Kuleshova L.G., Zinchenko A.V., Chekanova V.V. Investigation of the physical states of the binary systems of water – glycerol ethoxylated with a degree of polymerization of $n = 5$ and 25 at temperatures below 273 K using cryomicroscopy // Dopovidi of the National Academy of Sciences of Ukraine. – 2007. – N4. – P. 78–84.
12. Kozlov A.A., Prostakova T.M., Berkovskiy A.L. Manual for laboratory doctors for assessing hemoglobin content. – Moscow, 2006. – 26 p.
13. Kompaniets A.M., Nikolenko A.V., Chekanova V.V., Trots Yu.P. Cryopreservation of red blood cells under the protection of the ethoxylated glycerol oligomer // Problems of Cryobiology. – 2005. – Vol. 15, N3. – P. 561–565.
14. Kompaniets A.M., Nikolenko O.V., Chekanova V.V., Yesipova Yu.S. Cryoprotective efficiency of media based on oxyethyl derivatives of polyols during freezing of human erythrocytes // Problems of Cryobiology. – 2008. – Vol.18, N3. – P. 299–301.
15. Loevskiy M.M. Effect of glycerol (propane triol) and 1,2-propane diol on the structural and functional characteristics of cryopreserved erythrocytes: Author's abstract of thesis ... Candidate Biol. Sciences. – Kharkov, 1984. – 21 p.



18. Межидов С.Х., Моисеев В.А., Нардид О. А. Дегидратация эритроцитов компонентами криоконсервирующих сред // Криобиология и криомедицина. – 1989. – №2. – С. 13–16.
19. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике: Методы гематологических исследований. – М.: Медицина, 1987. – 363 с.
20. Ніколенко О.В., Єсіпова Ю.С., Компанієць А.М. Кріоконсервування еритроцитів людини під захистом полімергомологу оксигетильованого гліцерину (ОЕГ_{n=30}) // Гематологія і переливання крові. – 2008. – Т. 34, Вип. 2. – С. 166–170.
21. Рамазанов В.В., Бондаренко В.А. Осмотические свойства эритроцитов, замороженных в средах с непроницающими и проникающими криопротекторами // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, № 1. – С. 47–57.
22. Сводный список товаров, потребление и/или продажа которых запрещены, которые изъяты, строго ограничены или не утверждены правительствами. Лекарственные препараты / Департамент по экономическим и социальным вопросам. – Нью-Йорк, 1996. – 539 с.
23. Хайлачев Е.Е. Оптимизация программ криоконсервирования для резервирования гемотерапевтических средств: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – СПб, 2009. – 23 с.
24. Шраго М.И., Гучок М.М., Калугин Ю.В. Некоторые принципы направленного синтеза криопротекторов // Актуальные проблемы криобиологии / Под ред. Н.С.Пушкаря и А.М. Белоуса. – Киев: Наук. думка, 1981. – С. 157–201.
25. Chaudhari. S. Frozen red blood cells transfusion // MJAFI. – 2009. – Vol. 65, № 1. – P. 55–58.
26. Council of Europe guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. Recommendation R (95) 15, 11th. – Strasbourg: Council of Europe, 2005. – 266 p.
27. Fuller B.J. Cryoprotectants: The essential antifreezes to protect life in the frozen state // CryoLetters. – 2004. – Vol. 25, №6. – P. 375–388.
28. Gurtovenko A.A., Anwar J. Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide // J. Phys. Chem. B. – 2007. – Vol. 111, №33. – P. 10453–10460.
29. Holovati J.L., Gyongyossy-Issa M.I., Acker J.P. Effect of trehalose-loaded liposomes on red blood cell response to freezing and post-thaw membrane quality // Cryobiology. – 2009 – Vol. 58, №2. – P. 75–83.
30. Huggins C.E. Prevention of hemolysis of large volumes of red blood cells slowly frozen and thawed in the presence of dimethylsulfoxide // Transfusion. – 1963. – Vol. 3, № 1. – P. 483–493.
31. Lynch A.L., Chen R., Dominowski P.J. et al. Biopolymer mediated trehalose uptake for enhanced erythrocyte cryosurvival // Biomaterials. – 2010. – Vol. 31, №23. – P. 6096–6103.
32. Pribor D.B. Osmotic pemolysis contrasted with freeze-thaw hemolysis // Cryobiology. – 1971. – Vol. 8, №1. – P. 14–24.
33. Quan G., Zhang B. L., Guo Y. et al. Intracellular sugars improve survival of human red blood cells cryopreservation at –80°C in the presence of polyvinylpyrrolidone and human serum albumin // CryoLetters. – 2008. – Vol. 28, №2. – P. 95–108.
34. Singbartl K., Langer R., Henrich A. Altered membrane skeleton of hydroxyethylstarh-cryopreserved human erythrocytes // Cryobiology. – 1998 – Vol. 36, №2. – P. 115–123.
35. Sputtek A., Langer R., Singbartl G. Cryopreservation of red blood cells with the non-penetrating cryoprotectant hydroxyethyl starh // CryoLetters. – 1995. – Vol. 16, №4. – P. 283–288.
36. Sputtek A., Kuehnl P., Rowe A.W. Cryopreservation of erythrocytes, thrombocytes and lymphocytes // Transfus. Med. Hemother. – 2007. – Vol. 34, №4. – P. 262–267.
37. Sputtek A., Rowe A.W. Looking back from the future to the present: biopreservation will get us there // Transfus. Med. Hemother. – 2011. – Vol. 38, №1. – P. 85–87.
38. Stoll Ch., Wolkers W.F. Membrane stability during biopreservation of blood cells // Transfus. Med. Hemother. – 2011. – Vol. 38, №1. – P. 89–97.
16. Lubyanyi V.G., Bredikhina L.P., Shrago M.I. Cryoprotective activity of OEG oligomers in the red cell low temperature preservation // Kriobiologiya i Kriomeditsina. – 1981. – Issue 8. – P. 34–40.
17. Martynenko A.A., Lugovoy V.I. Effect of PEO-1500 and low temperatures on the isoosmotic resistance of human erythrocytes // Kriobiologiya i Kriomeditsina. – 1989. – Issue 8. – P. 13–16.
18. Mezhdidov S.H., Moiseyev V.A., Nardid O.A. Dehydration of erythrocyte caused by components of cryopreservation media // Kriobiologiya i Kriomeditsina. – 1989. – N2. – P. 13–16.
19. Menshikov V.V. Laboratory methods of investigation in the clinic: Methods of hematological studies. – Moscow: Meditsina, 1987. – 363 p.
20. Nikolenko O.V., Yesipova Yu.S., Kompaniyets A.M. Cryopreservation of human erythrocytes under protection of polymer homologue of oxyethylated glycerol (OEG_{n=30}) // Gematologiya i Perelyvannya Krovi. – 2008. – Vol. 34, N2. – P. 166–170.
21. Ramazanov V.V., Bondarenko V.A. Osmotic properties of erythrocytes frozen in media containing non-penetrating and penetrating cryoprotectants // Problems of Cryobiology. – 2010. – Vol. 20, N1. – P. 47–57.
22. Consolidated List of Products Whose Consumption and/or Sale Have Been Banned, Withdrawn, Severely Restricted or Not Approved by Governments. Pharmaceuticals. – New York, 1996. – 539 p.
23. Khaylachev E.E. Optimization of cryopreservation programs for backup of hemotherapeutical means: Author's abstract of thesis ... Candidate Med. Sciences. – St. Petersburg, 2009. – 23 p.
24. Shrago M.I., Guchok M.M., Kalugin Yu.V. Some principles of direct synthesis of cryoprotectants // In: Current Problems of Cryobiology / Eds. N.S. Pushkar and A.M. Belous. – Kiev: Naukova Dumka, 1981. – P. 157–201.
25. Chaudhari. S. Frozen red blood cells transfusion // MJAFI. – 2009. – Vol. 65, N1. – P. 55–58.
26. Council of Europe guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. Recommendation R (95) 15, 11th. – Strasbourg: Council of Europe, 2005. – 266 p.
27. Fuller B.J. Cryoprotectants: The essential antifreezes to protect life in the frozen state // CryoLetters. – 2004. – Vol. 25, N6. – P. 375–388.
28. Gurtovenko A.A., Anwar J. Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide // J. Phys. Chem. B. – 2007. – Vol. 111, N33. – P. 10453–10460.
29. Holovati J.L., Gyongyossy-Issa M.I., Acker J.P. Effect of trehalose-loaded liposomes on red blood cell response to freezing and post-thaw membrane quality // Cryobiology. – 2009 – Vol. 58, N2. – P. 75–83.
30. Huggins C.E. Prevention of hemolysis of large volumes of red blood cells slowly frozen and thawed in the presence of dimethylsulfoxide // Transfusion. – 1963. – Vol. 3, N1. – P. 483–493.
31. Lynch A.L., Chen R., Dominowski P.J. et al. Biopolymer mediated trehalose uptake for enhanced erythrocyte cryosurvival // Biomaterials. – 2010. – Vol. 31, N23. – P. 6096–6103.
32. Pribor D.B. Osmotic pemolysis contrasted with freeze-thaw hemolysis // Cryobiology. – 1971. – Vol. 8, N1. – P. 14–24.
33. Quan G., Zhang B. L., Guo Y. et al. Intracellular sugars improve survival of human red blood cells cryopreservation at –80°C in the presence of polyvinylpyrrolidone and human serum albumin // CryoLetters. – 2008. – Vol. 28, N2. – P. 95–108.
34. Singbartl K., Langer R., Henrich A. Altered membrane skeleton of hydroxyethylstarh-cryopreserved human erythrocytes // Cryobiology. – 1998 – Vol. 36, N2. – P. 115–123.
35. Sputtek A., Langer R., Singbartl G. Cryopreservation of red blood cells with the non-penetrating cryoprotectant hydroxyethyl starh // CryoLetters. – 1995. – Vol. 16, N4. – P. 283–288.



39. Sum A.K., Pablo J.J. Molecular study on the influence of dimethylsulfoxide on the structure of phospholipids bilayers // *Biophys. J.* – 2003. – Vol. 85, №6. – P. 3636–3645.
40. Takahashi T., Hirsh A., Williams R.J. Mechanism of cryoprotection by extracellular polymeric solution // *Biophys. J.* – 1988. – Vol. 54, №3. – P. 509–518.
41. Thomas M.J.G. The long term storage of blood cells // *Current problems of transfusion medicine in clinical practice* / Ed. by A.A.M. Todd, U. Rossi. – Milano: ESTM, 1993. – P. 117–120.
42. Thomas M. J.G., Parry E.S, Nash S.G., Bell S.H. A method for the cryopreservation of red blood cells using hydroxyethyl starch as a cryoprotectant // *Transfusion Science.* – 1996. – Vol. 17, №3. – P. 385–396.
43. Valery C.R., Ragno G., Van Houten P. et al. Automation of the glycerolization of red blood cells with high-separation bowl in Haemonetics ACP 215 instruments// *Transfusion.*– 2005.– Vol.45, №3.– P.1621–1627.
36. Sputtek A., Kuehnl P., Rowe A.W. Cryopreservation of erythrocytes, thrombocytes and lymphocytes // *Transfus. Med. Hemother.* – 2007. – Vol. 34, N4. – P. 262–267.
37. Sputtek A., Rowe A.W. Looking back from the future to the present: biopreservation will get us there // *Transfus. Med. Hemother.* – 2011. – Vol. 38, N1. – P. 85–87.
38. Stoll Ch., Wolkers W.F. Membrane stability during biopreservation of blood cells // *Transfus. Med. Hemother.* – 2011. – Vol.38, N1. – P. 89–97.
39. Sum A.K., Pablo J.J. Molecular study on the influence of dimethylsulfoxide on the structure of phospholipids bilayers // *Biophys. J.* – 2003 – Vol. 85, N6. – P. 3636–3645.
40. Takahashi T., Hirsh A., Williams R.J. Mechanism of cryoprotection by extracellular polymeric solution // *Biophys. J.* – 1988 – Vol. 54, N3. – P. 509–518.
41. Thomas M.J.G. The long term storage of blood cells // *Current problems of transfusion medicine in clinical practice* / Ed. by A.A.M. Todd, U. Rossi. – Milano: ESTM, 1993. – P. 117–120.
42. Thomas M. J.G., Parry E.S, Nash S.G., Bell S.H. A method for the cryopreservation of red blood cells using hydroxyethyl starch as a cryoprotectant // *Transfusion Science.* – 1996. – Vol. 17, N3. – P. 385–396.
43. Valery C.R., Ragno G., Van Houten P. et al. Automation of the glycerolization of red blood cells with high-separation bowl in Haemonetics ACP 215 instruments// *Transfusion.*– 2005.– Vol.45, N3.– P. 1621–1627.