

## Функциональная полноценность криоконсервированных тромбоцитов в зависимости от режимов замораживания

О.А. БОГДАНЧИКОВА, С.Е. ОВСЯННИКОВ, А.М. КОМПАНИЕЦ  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Functional Value of Cryopreserved Platelets Depending on Freezing Regimens

O.A. BOGDANCHIKOVA, S.YE. OVSYANNIKOV, A.M. KOMPANIETS  
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

В исследованиях по разработке новых криоконсервантов для низкотемпературного консервирования тромбоцитов установлен высокий уровень криозащитного действия среды, содержащей комбинацию двух криопротекторов – диметилацетамида (ДМАц) и оксизтилированного глицерина со степенью полимеризации  $n = 5$  (ОЭГ <sub>$n=5$</sub> ).

Цель работы – изучить функциональную полноценность тромбоцитов человека после криоконсервирования с разработанным криоконсервантом в зависимости от режимов замораживания.

Тромбоциты получали дифференцированным центрифугированием дозы донорской крови человека из лейкоцитомоноцитарного слоя. Замораживание образцов осуществляли после 30-минутной экспозиции тромбоцитов с криозащитной средой, содержащей 10%-ю суммарную концентрацию ДМАц/ОЭГ <sub>$n=5$</sub>  в плазме. Охлаждение контейнеров с суспензией тромбоцитов проводили с регулируемой скоростью в парах жидкого азота при температуре  $-40...-45^{\circ}\text{C}$  (режим 1) и  $-188...-193^{\circ}\text{C}$  (режим 2), а также с регулируемой скоростью в камере программного замораживателя (режим 3). ДМСО в наших исследованиях является веществом сравнения. Функциональную полноценность криоконсервированных тромбоцитов оценивали после удаления криопротекторов по следующим показателям: агрегация, индуцированная АДФ ( $200 \times 10^{-6}\text{M}$ ) и коллагеном ( $6,7 \times 10^{-3}\text{M}$ ), реакция на гипотонический шок; ретракция тромбоцитарного сгустка, содержание продуктов перекисного окисления липидов мембран тромбоцитов (основания Шиффа и гидроперекиси липидов), содержание антиоксидантных ферментов (глутатионпероксидаза и глутатионредуктаза).

Установлено, что для криоконсерванта ДМАц/ОЭГ <sub>$n=5$</sub>  наиболее высокий уровень функциональной полноценности тромбоцитов получен при охлаждении по режиму 2, что, по-видимому, связано с отсутствием переохлаждения (не регистрировалось) и быстрым прохождением плато кристаллизации ( $\approx 2$  мин). Для ДМСО более приемлемы режимы 1 и 3 с медленными скоростями охлаждения.

Использование нового криоконсерванта, содержащего комбинацию двух криопротекторов, и режима замораживания с быстрыми скоростями охлаждения позволило получить высокие и стабильные показатели функциональной полноценности криоконсервированных тромбоцитов. Следует подчеркнуть важное значение для результатов криоконсервирования таких факторов, как отсутствие переохлаждения внеклеточной среды и непродолжительное (до 2 мин) плато кристаллизации.

The investigations on development of novel cryoprotectant for low temperature preservation of platelets showed a high level of cryoprotective effect for medium, containing combination of two cryoprotectants: dimethyl acetamide (DMAc) and oxyethylated glycerol with polymerization degree of  $n = 5$  (OEG <sub>$n=5$</sub> ).

The research aim was to study the functional value of human platelets after cryopreservation with developed cryopreservative depending on freezing regimens.

The platelets were obtained by differentiated centrifugation of the sample of human donor blood by leukocyte-platelet layer method. The samples were frozen after 30 minutes of platelets exposure with cryoprotective medium containing 10% total concentration of DMAc/OEG <sub>$n=5$</sub>  in plasma. The containers with suspension of platelets were cooled without rate control in liquid nitrogen vapors under  $-40...-45^{\circ}\text{C}$  (regimen 1) and under  $-188...-193^{\circ}\text{C}$  (regimen 2), as well as with controlled rate in programmable freezer (regimen 3). In our study DMSO was the reference substance. After removing the cryoprotectants the frozen-thawed platelets were evaluated for functional value by the following parameters: ADP ( $200 \times 10^{-6}\text{M}$ ) and collagen ( $6,7 \times 10^{-3}\text{M}$ ) induced aggregation; hypotonic shock reaction; platelet clot retraction, content of lipid peroxidation products in platelet membranes (Schiff's bases and lipid hydroperoxides); content of antioxidant enzymes (glutathione peroxidase and glutathione reductase).

It was established that when using cryopreservative DMAc/OEG <sub>$n=5$</sub>  the highest level of platelet functional value was obtained under cooling regimen 2, and this was obviously due to the absence of supercooling (it was not recorded) and rapid passing through the crystallization plateau ( $\approx 2$  min). The regimens 1 and 3 were more admissible for DMSO under slow cooling rate.

The application of novel cryopreservative, containing combination of two cryoprotectants, and the freezing regimen with high cooling rates allowed to obtain a high and stable parameters of functional value of cryopreserved platelets. Major contribution in cryopreservation results of such factors as absence of extracellular medium supercooling and short (up to 2 min) crystallization plateau should be emphasized.