

OPEN ACCESS

DOI: 10.25040/ntsh2022.02.10

**For correspondence:** Public Institution «Institute for Blood Pathology and Transfusion Medicine of the Academy of Medical Sciences of Ukraine» General Chuprynka Street, 45, Lviv, 79057, Ukraine

**Twitter:** @VolodymyrOrlyk

**E-mail:** orlyk49@i.ua

**Received:** 14 June, 2022

**Accepted:** 05 Oct, 2022

**Published:** 30 Dec, 2022

**ORCID IDs**

Volodymyr Orlyk:

<https://orcid.org/0000-0003-1360-1975>

Bohdan Kondratskyi:

<https://orcid.org/0000-0001-8724-0979>

Mariya Vynarchyk:

<https://orcid.org/0000-0002-3012-2717>

Sofia Prymak:

<https://orcid.org/0000-0002-6673-1733>

Halyna Savuliak:

<https://orcid.org/0000-0002-8835-3147>

Vasyl Novak:

<https://orcid.org/0000-0002-5959-5018>

**Disclosures:** The authors declare there is no conflict of interest.

**Author Contributions:**

**Conceptualization:** Volodymyr Orlyk, Bohdan Kondratskyi;

**Results of study:** Mariya Vynarchyk, Sofia Prymak, Halyna Savuliak;

**Writing:** Volodymyr Orlyk, Bohdan Kondratskyi;

**Review & editing:** Vasyl Novak.

**Ethical approval:** April 27, 2022, Minutes of the meeting No. 04/04, Ethics Commission (Committee on Medical Ethics) at the Public Institution «The Institute for Blood Pathology and Transfusion Medicine of the Academy of Medical Sciences of Ukraine».

**Funding:** The research is a part of the planned research and development work of the Public Institution «The Institute for Blood Pathology and Transfusion Medicine of the Academy of Medical Sciences of Ukraine» "Substantiate Creation And Usage Of Colloid-Hyperosmolar Plasma Substitutes And Solutions For Blood Preservation And Red Blood Cells Resuspending" (state registration # 0113U003167), funded from the state budget of Ukraine.



© All authors, 2022

## Prolonged storage of thawed red blood cells

Volodymyr Orlyk<sup>1,2</sup>, Bohdan Kondratskyi<sup>2</sup>, Mariya Vynarchyk<sup>2</sup>, Sofia Prymak<sup>2</sup>, Halyna Savuliak<sup>1,2</sup>, Vasyl Novak<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

<sup>2</sup> Public Institution «Institute for Blood Pathology and Transfusion Medicine of the Academy of Medical Sciences of Ukraine», Lviv, Ukraine

**Introduction.** In modern transfusion practice, both in peacetime and in military conditions, red blood cells (RBCs) are widely used as the main component of donor blood. Cryopreserved red blood cells are considered the most safe and high-quality RBC-containing environment. However, the storage period of thawed RBCs after cryopreservation is limited to 24 hours, and significantly complicates their use. Therefore, extending the storage period of thawed RBCs is relevant for the blood service. Research objective: study the RBCs morphological state and functional completeness that were cryopreserved at  $-40^{\circ}\text{C}$  and stored for 7 days at a temperature of  $+2^{\circ}\text{C}$  -  $+4^{\circ}\text{C}$  after thawing.

**Materials and methods.** The object of the study were RBCs that were cryopreserved at  $-40^{\circ}\text{C}$  and stored for 7 days at a temperature of  $+2^{\circ}\text{C}$  -  $+4^{\circ}\text{C}$  after thawing. Deglycerolization of the thawed red blood cells, cryopreserved at  $-40^{\circ}\text{C}$ , required three time washing by using reverse cytoagglomeration. Thawed RBCs were re-suspended in lactate-sucrose-phosphate solution. After RBC thawing and storage for 7 days (186 doses) in the suspension the following indicators were studied: free hemoglobin, extracellular potassium, adenosine triphosphoric acid (ATP), 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG), hematocrit, degree of hemoglobin affinity to oxygen ( $P_{50}$ ), viscosity coefficient, osmotic stability, electrophoretic mobility of erythrocytes. as well as the total number of cells lost and recovered.

**Results.** After storage for 7 days of suspension of thawed RBCs at a temperature of  $+2^{\circ}\text{C}$  -  $+4^{\circ}\text{C}$  indicators of free hemoglobin ( $0,62\pm 0,02$  g/l), extracellular potassium ( $2,7\pm 0,3$  mmol/l), hematocrit ( $0,4\pm 0,02$  l/l) were within normal limits. Osmotic resistance ( $0,46\pm 0,02\%$ ), electrophoretic mobility ( $0,94\pm 0,04$   $\mu\text{m}\cdot\text{cm}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) of RBCs, suspension viscosity factor

( $5,5\pm 0,20$  mPa·C) did not exhibit changes in comparison with normal values. High levels of ATP indicators ( $3,0\pm 0,2$   $\mu\text{mol/gHb}$ ) and 2,3-DPG ( $10,5\pm 1,3$   $\mu\text{mol/gHb}$ ) were established. Indicator  $P_{50}$  ( $24,1\pm 1,3$  hPa) corresponded to low hemoglobine affinity for oxygen. After 7-day storage at  $+2^{\circ}\text{C}$  -  $+4^{\circ}\text{C}$  total cell loss was insignificant and amounted to  $5,6\pm 0,4\%$ . High percentage of viable thawed RBCs  $94,4\pm 0,5\%$  was shown.

## Пролонгація зберігання розморожених еритроцитів

Володимир Орлик<sup>1,2</sup>, Богдан Кондрацький<sup>2</sup>, Марія Винарчик<sup>2</sup>,  
Софія Примак<sup>2</sup>, Галина Савуляк<sup>1,2</sup>, Василь Новак<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, м. Львів, Україна

<sup>2</sup> Державна установа «Інститут патології крові та трансфузійної медицини Національної академії медичних наук України», м. Львів, Україна

**Вступ.** У сучасній трансфузіологічній практиці в мирний час і в умовах військових дій широко застосовують еритроцити – основний компонент донорської крові. Найбільш безпечним і якісним еритроцитовмісним середовищем вважаються кріоконсервовані еритроцити. Однак строк зберігання розморожених після кріоконсервації еритроцитів обмежений 24 годинами, що значно утруднює їх застосування. Тому актуальним для служби крові є пролонгація строку зберігання розморожених еритроцитів. Мета роботи – вивчити морфологічний стан і функціональну повноцінність кріоконсервованих за  $-40^{\circ}\text{C}$  еритроцитів, які зберігалися після розморожування 7 діб за температури  $+2^{\circ}\text{C}$  -  $+4^{\circ}\text{C}$ .

**Методи дослідження.** Об'єктом дослідження були кріоконсервовані за  $-40^{\circ}\text{C}$  еритроцити, які зберігалися після розморожування 7 діб за температури  $+2^{\circ}\text{C}$  -  $+4^{\circ}\text{C}$ . Для дегліцеринізації розморожених еритроцитів, кріоконсервованих за  $-40^{\circ}\text{C}$ , застосовували триразове відмивання методом зворотної цитагломерації. Ресуспендували розморожені еритроцити у лактатно-сахарозо-фосфатному розчині. В залежності еритроцитів після їх розморожування і зберігання 7 діб (186 доз) вивчали показники: вільного гемоглобіну, позаклітинного калію, аденозинтрифосфору (АТФ), 2,3-дифосфогліцерату (2,3-ДФГ), гематокриту, ступеня спорідненості гемоглобіну до кисню ( $P_{50}$ ), коефіцієнта в'язкості, осмотичної стійкості, електрофоретичної рухливості еритроцитів, а також загальну кількість втрачених і відновлених клітин.

**Результати.** Після зберігання протягом 7 діб за температури  $+2^{\circ}\text{C}$  -  $+4^{\circ}\text{C}$  в залежності розморожених еритроцитів показники вільного гемоглобіну ( $0,62 \pm 0,02$  г/л), позаклітинного калію ( $2,7 \pm 0,3$  ммоль/л), гематокриту ( $0,4 \pm 0,02$  л/л) були в межах нормальних величин. Осмотична стійкість ( $0,46 \pm 0,02\%$ ), електрофоретична рухливість ( $0,94 \pm 0,04$  мкм·см·В<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup>) еритроцитів, коефіцієнти в'язкості ( $5,5 \pm 0,20$  мПа·с) не змінювалися порівняно з нормою. Встановлено нормальний рівень показників АТФ ( $3,0 \pm 0,2$  мкмоль/гНб) і 2,3-ДФГ ( $10,5 \pm 1,3$  мкмоль/гНб). Показник  $P_{50}$  ( $24,1 \pm 1,3$  гПа) відповідав низькій спорідненості гемоглобіну до кисню. Після зберігання протягом 7 діб за  $+2^{\circ}\text{C}$  -  $+4^{\circ}\text{C}$  загальна втрата клітин була незначною і становила  $5,6 \pm 0,4\%$ . Виявлено високий відсоток виходу повноцінних розморожених еритроцитів  $94,4 \pm 0,5\%$ .

## OPEN ACCESS

DOI: 10.25040/ntsh2022.02.10

Адреса для листування: Державна установа «Інститут патології крові та трансфузійної медицини Національної академії медичних наук України», вул.Генерала Чупринки, 45, м.Львів, Україна, 79057

Твіттер: @VolodymyrOrlyk

Е-пошта: orlyk49@i.ua

Надійшла до редакції: 14.06.2022

Прийнята до друку: 05.10.2022

Опублікована: 30.12.2022

### ORCID IDs

Володимир Орлик:

<https://orcid.org/0000-0003-1360-1975>

Богдан Кондрацький:

<https://orcid.org/0000-0001-8724-0979>

Марія Винарчук:

<https://orcid.org/0000-0002-3012-27-17>

Софія Примак:

<https://orcid.org/0000-0002-6673-1733>

Галина Савуляк:

<https://orcid.org/0000-0002-8835-3147>

Василь Новак:

<https://orcid.org/0000-0002-5959-5018>

**Конфлікт інтересів:** Автори декларують, що немає конфлікту інтересів.

### Особистий внесок авторів:

**Створення концепції:** Володимир Орлик, Богдан Кондрацький;

**Результати дослідження:** Марія Винарчик, Софія Примак, Галина Савуляк;

**Написання:** Володимир Орлик, Богдан Кондрацький;

**Редагування та затвердження остаточного варіанту:** Василь Новак.

**Дозвіл комісії з питань біоетики:** Комісія з питань етики (комітет з медичної етики) при Державній установі «Інститут патології крові та трансфузійної медицини Національної академії медичних наук України (протокол засідання № 04/ від 27 квітня 2022р.).

**Фінансування:** Дослідження є частиною планової науково-дослідної роботи Державної установи «Інститут патології крові та трансфузійної медицини Національної академії медичних наук України» "Обґрунтувати створення та застосування колоїдно-гіперосмолярних плазмозамінників та розчинів для консервування крові і ресуспендування еритроцитів" (№ державної реєстрації 0113U003167), що профінансовано видатками державного бюджету України.



© Всі автори, 2022

**Conclusions.** Deglycerolization of thawed red blood cells, cryopreserved at  $-40^{\circ}\text{C}$ , by reverse cytoagglomeration, as well as use of lactate-sucrose-phosphate solution for washed RBCs resuspending promote prolongation of thawed RBCs storage period up to 7 days at  $+2^{\circ}\text{C}$  -  $+4^{\circ}\text{C}$  in viable condition.

**Keywords:** Hematology, red blood cells, cryopreservation, thawing.

### Introduction

Improving blood system is a strategic task which affects provision of medical aid in peaceful time as well as during military operations [1,2,3]. Practical medicine makes extensive use of RBCs which are one of the donor blood major components. According to the modern data, the safest RBC-containing environment for recipient are thawed washed RBCs [4,5,6,7]. Cryobiology success allowed to consider cryopreservation to be an effective method of long-term blood cell storage [8,9,10,11,12]. There are two technological possibilities to cryopreserve RBCs. The first method is fast freezing and long-term RBCs storage at ultra-low temperature [13]. Practical implementation of this method requires complicated, cumbersome, expensive equipment with usage of liquid nitrogen. Another method is slow cooling and long-term storage of blood cell components (RBCs) at moderately low temperatures in electric refrigerators. The preference is given to more economic and simple methods of RBCs freezing and storage at moderately low temperatures [14,15]. But widespread clinical use of cryopreserved RBCs (irrespective of preservation method) is hindered by the storage period of thawed RBCs which is limited to 24 hours. Therefore, the issue of developing rational methods of thawed RBCs deglycerolization, as well as creation of special resuspending solutions to maintain RBCs functional properties during the post-thaw storage period, for the period exceeding 24 hours, is topical for the modern blood system [8,16,17,18]. Objective. To study the morphological state and functional capabilities of RBCs, that were cryopreserved at  $-40^{\circ}\text{C}$  and stored after thawing for 7 days at a temperature of  $+2^{\circ}\text{C}$  -  $+4^{\circ}\text{C}$ .

### Materials and Methods

The object of the study were cryopreserved RBCs at  $-40^{\circ}\text{C}$ , which were stored after thawing for 7 days at a temperature of  $+2^{\circ}\text{C}$  -  $+4^{\circ}\text{C}$ . To obtain red blood cell component 1-day storage blood was used, obtained with informed

consent from donors meeting all the procedural requirements under the Law of Ukraine [19]. In transfusion substances technology lab in PI IBP & TM AMSU, under aseptic conditions, plasma and white and platelet layers were removed by aspiration from hemocontainers ("Hemakon", "RAVIMED" with hemopreservative CPDA-1 (Poland)) with whole donated blood. Free from plasma and white and platelet layers RBCs were transferred into sterile polymer cryocontainers CS 1000 and were supplemented in equal proportion (1:1) protective solution – cryopreservative, which contained: glycerol (State Pharmacopoeia of Ukraine, issue 1, p.355) – 791,2 g, dinatrii aethylendiamintetraacetat (State Pharmacopoeia of Ukraine, issue 1, appendix 1.1, p.327) – 3,0 g, glucosum anhydricum (State Pharmacopoeia of Ukraine, issue 1, appendix 1.1, p.360) – 90,0 g and aqua ad iniectabilia (State Pharmacopoeia of Ukraine, issue 1, appendix 1.1, p.307) - to 1000,0 ml. The final concentration of glycerol in the mix was 39,6%. After completion of glycerolization air was removed from the cryocontainer and the cryocontainer was sealed. RBCs, suspended in cryoprotective solution, were kept for 30 minutes at room temperature. After this cryocontainers with the mix of RBCs and cryopreservative were placed in low temperature electric refrigerators "Frigera" NZ280/75A or "Frigera" HZ700/50.2 (the Czech Republic) for freezing and storage up to 2 years at  $-40^{\circ}\text{C}$ . 186 doses of RBCs were studied (table 1).

Table 1

**The number of RBCs doses  
frozen at  $-40^{\circ}\text{C}$ ,  
depending on their storage periods**

Red blood cells storage periods in frozen condition at temperature $-40^{\circ}\text{C}$	The number of RBCs doses frozen at temperature $-40^{\circ}\text{C}$
Up to 6 months	36
From 6 months to 1 year	45
From 1 to 1,5 year	51
From 1,5 to 2 years	54
Total:	186

**Висновки.** Застосування дегліцеринізації розморожених еритроцитів, кріоконсервованих за  $-40^{\circ}\text{C}$ , методом зворотної цитагломерації, а також застосування лактатно-сахарозо-фосфатного розчину для ресуспендування відмитих еритроцитів дають змогу подовжити строк зберігання розморожених еритроцитів до 7 діб за температури  $+2^{\circ}\text{C}$ - $+4^{\circ}\text{C}$  у повноцінному стані.

**Ключові слова:** гематологія, еритроцити, кріоконсервування, розморожування.

### Вступ

Вдосконалення системи крові країни є стратегічним завданням, від реалізації якого залежить якість надання медичної допомоги в мирний час, а також в умовах військових дій [1,2,3]. У практичній медицині широко застосовують еритроцити – один з основних компонентів донорської крові. Згідно з сучасними даними, найбільш безпечним для реципієнта еритроцитомісним середовищем є розморожені відмиті еритроцити [4,5,6,7]. Успіхи в галузі кріобіології дають підстави вважати кріоконсервування ефективним методом довготривалого зберігання клітин крові [8,9,10,11,12]. Існують дві технологічні можливості кріоконсервування еритроцитів. Перший метод – це швидке заморожування та довготривале зберігання еритроцитів за ультра низьких температур [13]. Для практичного впровадження цього методу необхідне складне, громіздке, вартісне обладнання із застосуванням рідкого азоту. Інший метод – повільне охолодження і довготривале зберігання клітинних компонентів крові (еритроцитів) за помірно низьких температур в електрорефрижераторах. Перевага надається більш економічним і простим методам заморожування та зберігання еритроцитів за помірно низьких температур [14,15]. Але широкому клінічному впровадженню кріоконсервованих еритроцитів (незалежно від методу консервації) перешкоджає обмежений до 24 годин строк зберігання розморожених еритроцитів. Тому питання розробки раціональних методів дегліцеринізації розморожених еритроцитів, а також створення спеціальних ресуспендуючих розчинів для підтримки функціональних властивостей еритроцитів у процесі їх зберігання після розморожування, триваліше ніж 24 години, залишається актуальним для сучасної служби крові [8,16,17,18]. Мета: вивчити морфологічний стан і функціональні можливості кріоконсервованих за  $-40^{\circ}\text{C}$  еритроцитів, які зберігалися після розморожування 7 діб за температури  $+2^{\circ}\text{C}$  -  $+4^{\circ}\text{C}$ .

### Матеріали і методи досліджень

Об'єктом дослідження були кріоконсервовані за  $-40^{\circ}\text{C}$  еритроцити, які зберігалися після розморожування 7 діб за температури  $+2^{\circ}\text{C}$  -  $+4^{\circ}\text{C}$ . Для отримання компонента еритроцитів використовували кров однодобового строку зберігання, отриману за інформованою згодою від донорів з виконанням всіх процедурних вимог відповідно до Закону України [19]. В лабораторії технологій трансфузійних препаратів Державної установи Інститут патології крові та трансфузійної медицини Національної академії медичних наук України (ДУ ІПКТМ НАМНУ), в асептичних умовах, із гемоконтейнерів («Гемакон», «RAVIMED» з гемоконсервантом CPDA-1, (Польща)) з цільною донорською кров'ю методом аспірації видаляли плазму і лейкоцитарно-тромбоцитарний шар. Еритроцити, звільнені від плазми і лейкоцитарно-тромбоцитарного шару, переносили у стерильні полімерні кріоконтейнери CS 1000 і додавали до них у рівній пропорції (1:1) захисний розчин-кріоконсервант, який містив: гліцерин (glycerolum) (ДФУ вип.1, с.355) – 791,2 г, динатрієву сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти (dinatrii aethylendiamintetraoetas) (ДФУ вип.1 додаток 1.1, с.327) – 3,0 г, глюкозу (glucosum anhydricum) (ДФУ вип.1 додаток 1.1, с.360) – 90,0 г та воду для ін'єкцій (aqua ad iniectabilia) (ДФУ вип.1 додаток 1.1, с.307) – до 1000,0 мл. Кінцева концентрація гліцерину в суміші становила 39,6%. Кріоконтейнери з сумішшю еритроцитів та кріоконсерванта розміщували у низькотемпературних електрорефрижераторах «Frigera» NZ280/75.A або «Frigera» HZ700/50.2 (Чеська Республіка) для заморожування та зберігання до 2-х років за температури  $-40^{\circ}\text{C}$ . Досліджено 186 доз еритроцитів (Таблиця 1).

Відтаювання заморожених еритроцитів проводили у водяній бані за температури  $+38^{\circ}\text{C}$ - $+40^{\circ}\text{C}$ . З метою відмивання еритроцитів від гліцерину (процес дегліцеринізації) застосовували феномен зворотної цитагломерації еритроцитів у низькоіонному середовищі, що утворюється завдяки розчинам цукрів.

Thawing of the frozen RBCs was done in water bath at +38°C - +40°C. Suspension of the thawed RBCs was transferred into plasticized 1000,0 ml volume containers. To wash the RBCs from glycerol (deglycerolization process) the phenomenon of reverse cytoagglomeration of RBCs in low-ion environment, created due to sugars solutions. Glucose solutions of 30%, 10%, 5% were used. In the process of deglycerinization, thawed RBCs were added to the 30% glucose solution in the amount of 100 ml per 250 ml of the thawed RBCs mix was added to the mix of thawed RBCs and then it was mixed. In 2-3 minutes the mixture of RBCs and 30% glucose solution was mixed with 10% glucose solution in the amount equal to 4 volumes of frozen RBCs. After mixing there was RBCs agglomeration and their sedimentation. The fluid above the sediment was removed. The agglomerated RBCs were once again mixed with 4 volumes of 10% glucose solution, After the RBCs settled, the washing fluid was removed. To prevent RBCs haemolysis and preserve in the mixture greater number of recovered cells the RBCs were mixed with 5% glucose solution, which was twice bigger in terms of volume than the volume of thawed RBCs. After sedimentation of agglomerated RBCs the fluid on top of the sediment was removed. Three times washing of the thawed RBCs promoted RBCs freeing from cryopreservative-glycerol and significant amount of free hemoglobin. Resuspending of agglomerated RBCs was done by adding to them two volumes of 0,9% saline solution, prepared according to the "Guideline" [20]. The latter procedure was applied to achieve complete deaggregation of thawed RBCs and to fully preserve their functional viability to prolong their storage term at temperature +2°C - +4°C. Deagglomerated RBCs were transferred to the polymer hemocontainers with 300,0 ml volume centrifuged at 1100 g during 10-12 minutes at +4°C (centrifuge PC-6Mц, "Dastan", Kyrgyzstan). The liquid that was above the sediment containing excess free hemoglobin was removed. Deglycerinized RBCs, were resuspended in the plasma-substituting lactate-sucrose-phosphate solution at the ratio of 1:1 or 1:½. Components of plasma-substituting solution: sucrose (PhEur, 10.0) - 7,0 g, dinatrii phosphas dodecahydricus (State Pharmacopoeia of Ukraine, issue 1, p.365) - 0,2 g, sodium hydrocitrate dibasic 1,5 liqour (State Pharmacopoeia of Ukraine, issue.2, p.493) -

0,1 g, sodium lactate (PhEur, 10.0) - 1,75 g and aqua ad iniectabilia (State Pharmacopoeia of Ukraine, issue 1, appendix 1.1, p.307) - up to 100,0 ml; pH solution - 6,8.

RBCs freezing, thawing, washing and resuspending procedures were performed under sterile conditions.

Thawed deglycerolized RBCs, resuspended in plasma-substituting lactate-sucrose-phosphate solution, prior usage in the clinic were stored in the refrigerators ("Dnipro", Ukraine) at temperature +2°C - +4°C during 7 days.

Immediately after thawing of RBCs, their deglycerolization, resuspension in lactate-sucrose-phosphate solution and on the 7th storage day at +2°C - +4°C the obtained RBCs were analysed with respect to the changes in the indicators' dynamics:

- the content of free hemoglobin in the RBCs sediment using the ABX MICROS 60-OT analyzer (France);
- extracellular potassium level by flame photometry on FPL-1 device (Ukraine);
- Viscosity factor by formula:

$$\mu = \frac{1,06 \cdot \text{RBCs susp.}}{T_w} \text{ (mPa.s)},$$

taking water density as  $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$ ,

where  $\mu$  - viscosity factor (mPa.s);

1,06 - blood density in  $\text{g/cm}^3$ ;

TRBCs susp. - time for 1 ml RBCs suspension outflow;

$T_w$  - time for 1 ml of water outflow [20];

- corpuscular volume with ABX MICROS 60-OT analyzer (France);
- RBCs osmotic resistance [21];
- degree of hemoglobin affinity for oxygen ( $P_{50}$ ) [22];
- 2,3-diphosphoglycerate concentration (2,3-DPG) - indicator of RBCs oxygen delivery function [23];
- concentration of adenosine triphosphoric acid (ATP) - RBCs viability indicator [24].
- the number of red blood cells lost after all cryopreservation procedures (mixing RBCs with cryopreservative, freezing, thawing, washing, resuspending) and on the 7th day of post-thaw storage at +2°C - +4°C was determined by calculation method:

Таблиця 1

**Кількість доз заморожених еритроцитів залежно від строків їх зберігання за температури -40°C**

Строки зберігання еритроцитів в замороженому стані за температури -40 °С	Кількість доз еритроцитів, заморожених за -40 °С
До 6 місяців	36
Від 6 місяців до 1 року	45
Від 1 до 1,5 року	51
Від 1,5 до 2 років	54
Всього:	186

Використовували 30%, 10%, 5% розчини глюкози. В процесі дегліцеринізації до суміші розморожених еритроцитів додавали 30% розчин глюкози в кількості 100 мл на 250 мл суміші розморожених еритроцитів і змішували. Через 2 – 3 хвилини до суміші еритроцитів з 30% розчином глюкози додавали 10% розчин глюкози в кількості, що дорівнювала 4 об'ємам заморожених еритроцитів. Після змішування відбувалася агрегація еритроцитів та їх осідання. Рідину, що була над осадом, видаляли. До агрегованих еритроцитів повторно додавали 4 об'єми 10% розчину глюкози. Після того як еритроцити осідали, відмивну рідину видаляли. Щоб попередити гемоліз еритроцитів, а також для збереження в суміші більшої кількості відновлених клітин, до еритроцитів додавали 5% розчин глюкози, який вдвічі перевищував об'єм розморожених еритроцитів. Після осідання агрегованих еритроцитів рідину, що була над осадом, видаляли. Триразове відмивання розморожених еритроцитів сприяло звільненню еритроцитів від криоконсерванту-гліцерину та значної кількості вільного гемоглобіну. Ресуспендування агрегованих еритроцитів проводили шляхом додавання до них двох об'ємів 0,9% розчину хлориду натрію. Застосовували цю процедуру для повної деагрегації розморожених еритроцитів, а також з метою збереження їх функціональної повноцінності для продовження строку їх зберігання за температури +2°C–+4°C. Деагреговані еритроцити переводили в полімерні гемоконтейнери об'ємом 300,0 мл і центрифугували при 1100 g впродовж 10 - 12 хв за температури +4°C (центрифуга РС-6Мц, «Дастан», Киргизія). Рідину, яка була над осадом і яка містила надлишкову кількість вільного гемоглобіну, видаляли. Дегліцеринізовані еритроцити, які залишалися в ємності, ресуспендували в плазмозамінному лактатно-сахарозо-фосфатному

розчині у співвідношенні 1:1 або 1:1/2. Пропис плазмозамінного розчину: сахароза (sucrose) (PhEur, 10.0) - 7,0 г, динатрію фосфат додекафосфат (dinatrii phosphas dodecahydricus) (ДФУ вип.1, с.365) – 0,2 г, натрію гідроцитрат двохзаміщений 1,5 водний (ДФУ вип.2, с.493) - 0,1 г, натрію лактат (sodium lactate) (PhEur, 10.0) – 1,75 г та вода для ін'єкцій (aqua ad iniectionem) (ДФУ вип.1 додаток 1.1, с.307) - до 100,0 мл. рН розчину – 6,8. Процедури заморожування, розморожування, відмивання та ресуспендування еритроцитів виконували в стерильних умовах.

Розморожені дегліцеринізовані еритроцити, ресуспендовані в плазмозамінному лактатно-сахарозо-фосфатному розчині, зберігали в холодильниках («Дніпро», Україна) за температури +2°C–+4°C впродовж 7 діб.

Безпосередньо після розморожування еритроцитів, їх дегліцеринізації, ресуспендування в лактатно-сахарозо-фосфатному розчині і на 7-му добу зберігання за +2°C - +4°C в отриманій зavisі еритроцитів аналізували динаміку змін показників:

- вмісту вільного гемоглобіну в над осаді еритроцитів за допомогою аналізатора АВХ MICROS 60-OT (Франція);
- вмісту позаклітинного калію методом полум'яної фотометрії на апараті ФПЛ-1 (Україна);
- коефіцієнта в'язкості за формулою

$$\mu = \frac{1,06 \cdot \text{Тер.зав.}}{T_v} \quad (\text{мПа} \cdot \text{с}),$$

приймавши щільність води  $\rho = 1 \text{ г/см}^3$ ,

- де  $\mu$  – коефіцієнт в'язкості (мПа.с);
- 1,06 – щільність крові в  $\text{г/см}^3$ ;
- Тер.зав. – час, за який витікає 1 мл зависини еритроцитів;
- $T_v$  – час, за який витікає 1 мл води [20];

- гематокритної величини за допомогою аналізатора АВХ MICROS 60-OT (Франція);
- осмотичної стійкості еритроцитів [21];
- ступеня спорідненості гемоглобіну до кисню ( $P_{50}$ ) [22];
- концентрації 2,3-дифосфогліцерату (2,3-ДФГ) [23];
- вмісту аденозинтрифосфорної кислоти (АТФ) [24];
- кількість втрачених еритроцитів після всіх процедур криоконсервування (змішування

$$\begin{aligned} & \text{total cell loss (\%)} = \\ & = \frac{\text{Hb free of washing solutions} + \text{Hb free of suspension}}{\text{Hb total}} \times 100 \end{aligned}$$

where Hb total – total hemoglobin in a frozen dose (g);  
100 – factor of converting in percentage;

number of the recovered RBCs after all the cryopreservation procedures (mixing red blood cells with cryopreservative, freezing, thawing, washing, resuspending) and on the 7th post-thawing storage day at temperature +2°C - +4°C was calculated by formula:

$$\begin{aligned} & \text{number of the RBCs recovered} = \\ & = \frac{\text{Hb cellular}}{\text{Hb cellular} + \text{Hb free of washing solutions}} \times 100, \end{aligned}$$

where Hb<sub>cellular</sub> – total hemoglobin of the entire dose of the washed RBCs concentrate (g);  
Hb<sub>free</sub> – free hemoglobine, dissolved in the entire volume of the washed RBCs (g);  
100 – percentage conversion factor;

- RBCs electrophoretic mobility (EPM) – with "Opton" cytopherometer (Germany) under standard conditions [25]: current - 5 mA, voltage - 100 V, suspension fluid temperature - 25°C. Normal saline was taken as suspension fluid, buffered with phosphate buffer to pH 7,28-7,30. Time necessary for the cell to cover a certain distance (two squares of a grid net micrometer) was calculated with a stopwatch. In each specific case the speed of movement of 40-50 cells was counted.

Package "STATISTICA FOR WINDOWS 6.0" (Statsoft, USA) was used to provide statistic processing of the results. Difference probability between average indicators (p) in groups, which were compared, were established with Student's t-test (t); difference probability between average values was taken as p<0,05.

## Results

We conducted a study of stability and morphological completeness of cryopreserved RBCs at -40°C, which were stored after thawing for 7 days at a temperature of +2°C - +4°C. To achieve this, the intactness of their

membranes, as well as the degree of destruction (hemolysis) was studied by the indicators of the free hemoglobin content, the concentration of extracellular potassium, electrophoretic mobility, the number of lost cells and the yield of restored cells. We evaluated the possibilities of engraftment of thawed RBCs by studying their osmotic stability in vitro.

In order to evaluate the viability, energy potential, the possibilities of the oxygen transport function, the ability to give oxygen to the tissues by thawed RBCs during the 7-day storage period at a temperature of +2°C - +4°C, we studied the content of ATP in RBCs (an indicator of viability, energy potential) and 2,3-DFG (an indicator of oxygen transport function), as well as the degree of their hemoglobin affinity to oxygen (an indicator of P<sub>50</sub>).

As it is shown by data in table 2 in the suspension of the thawed RBCs on the 7th storage day at +2°C - +4°C free hemoglobine content was normal and did not exceed the transfusion value of 1, 2 g/l acceptable in the clinic, which demonstrated RBCs resistance, stability, no destruction, haemolysis.

Extracellular potassium level indicator on the 7th day of storage at +2°C - +4°C fluctuated within normal values (table 2). It showed that a RBC membrane was preserved.

An important criterion characterizing the effectiveness of the washing and resuspension process is the value of cell loss and cell recovery. After 7 days of storage of thawed RBCs at temperature +2°C - +4°C, the total cell loss was insignificant and amounted to 5.6 ± 0.4%. It was established that the use of deglycerolization of thawed RBCs by reverse cytoagglomeration, as well as the use of lactate-sucrose-phosphate solution for their resuspension ensured a high yield of 94.4 ± 0.5%. of recovered viable cells after their 7-day storage at + 2°C - +4°C.

To determine the integrity of thawed RBCs cellular membrane depending on the storage at +2°C - +4°C their electrophoretic mobility was studied (EPM). The research has shown that on the 7th day of storage EPM of thawed RBCs was within normal values (table 2). The findings have shown no thawed RBCs membrane changes during 7-day storage at +2°C - +4°C.

еритроцитів з криоконсервантом, заморожування, відтаювання, відмивання, ресуспендування) і на 7-му добу зберігання після розморожування за температури +2°C - +4°C визначали за допомогою розрахункового методу

$$\text{Загальні втрати клітин (\%)} = \frac{\text{Hb вільний відмивних розчинів} + \text{Hb вільний завісини}}{\text{Hb загальний}} \times 100,$$

де Hb загальний – загальний гемоглобін в замороженій дозі (г);  
100 – фактор переведення у відсотки;

- кількість відновлених еритроцитів після всіх процедур криоконсервування (змішування еритроцитів з криоконсервантом, заморожування, відтаювання, відмивання, ресуспендування) і на 7-му добу зберігання після розморожування за температури +2°C - +4°C визначали за формулою

$$\text{Кількість відновлених еритроцитів} = \frac{\text{Hb клітинний}}{\text{Hb клітинний} + \text{Hb вільний відмивної рідини}} \times 100$$

де Hb клітинний – загальний гемоглобін всієї дози відмитого еритроцитного концентрату (г);

Hb вільний - гемоглобін вільний, розчинений у всьому об'ємі відмитих еритроцитів (г);  
100 – фактор переведення у відсотки;

- електрофоретичної рухливості еритроцитів (ЕФР) - за допомогою цитоферометра фірми «Opton» (ФРН) в стандартних умовах [25]: сила струму - 5 мА, напруга - 100 В, температура суспензійної рідини - 25°C. Як суспензійну рідину використовували фізіологічний розчин, забуферений фосфатним буфером до рН 7,28-7,30. Час, за який клітина проходила відповідний шлях (два квадрати сітчастого мікрометра), підраховували за допомогою секундоміра. В кожному конкретному випадку підраховували швидкість переміщення 40-50 клітин.

Для статистичного опрацювання результатів використовували пакет програм «STATISTICA FOR WINDOWS 6.0» (Statsoft, USA). Вірогідність різниці між середніми показниками (р) в групах, які порівнювали-

ся, визначали за параметричним критерієм Стьюдента (t); вірогідність різниці між середніми величинами приймалась за  $p < 0,05$ .

### Результати дослідження

Ми провели дослідження стійкості, стабільності, морфологічної повноцінності еритроцитів, криоконсервованих за -40 °С, які зберігалися після розморожування 7 діб за температури +2°C - +4°C. Для цього вивчено інтактність їхніх мембран, а також ступінь руйнування (гемолізу) за допомогою дослідження показників вмісту вільного гемоглобіну, концентрації позаклітинного калію, електрофоретичної рухливості, кількості втрачених клітин і виходу відновлених. Ми оцінили *in vitro* можливості приживлення розморожених еритроцитів за допомогою вивчення їхньої осмотичної стійкості.

Для того, щоб оцінити життєздатність, енергетичний потенціал, можливості киснево-транспортної функції, спроможність віддачі кисню тканинам розморожених еритроцитів 7-ми добового терміну зберігання за температури +2°C - +4°C, ми вивчали вміст в еритроцитах АТФ (показник життєздатності, енергетичного потенціалу) і 2,3-ДФГ (показник киснево-транспортної функції), а також ступінь спорідненості їх гемоглобіну до кисню (показник  $P_{50}$ ).

Як свідчать наведені в табл. 2 дані, в залежності від розморожених відмитих еритроцитів на 7-му добу зберігання за +2°C–+4°C вміст вільного гемоглобіну був в нормі, що свідчило про стійкість, стабільність еритроцитів, відсутність їх руйнування, гемолізу.

Показник концентрації позаклітинного калію на 7-му добу зберігання за +2°C–+4°C коливався в межах нормальної величини (табл. 2). Це свідчило про збереження клітинної мембрани еритроцитів.

Важливим критерієм, який характеризує ефективність процесу відмивання і ресуспендування, є величина втрати клітин і вихід відновлених. Після 7-ми діб зберігання розморожених еритроцитів за температури +2°C–+4°C загальна втрата клітин була незначною і становила  $5,6 \pm 0,4\%$ . З'ясовано, що застосування дегліцеринізації розморожених еритроцитів методом зворотної цитагломерації, а також застосування лак-

Table 2

**Indicators of the morphological state and functional capabilities of cryopreserved RBCs at -40°C immediately after thawing and on the 7th day of storage at a temperature of +2°C - +4°C ( n = 186)**

Indicators under study	Statistical indicators	Reference values	Immediately after thawing	7 <sup>th</sup> storage day at +4 °C
Hematocrit, l/l	$M \pm m$ $p$	0,36-0,46 males 0,41-0,53 females	0,39 ± 0,01	0,40 ± 0,02 > 0,05
Free hemoglobin, g/l	$M \pm m$ $p$	0,20-0,70	0,35 ± 0,03	0,42 ± 0,02 > 0,05
Extracellular potassium, mmol/L	$M \pm m$ $p$	1,2-8,9	1,7 ± 0,2	2,3 ± 0,4 > 0,05
ATP, mcmol/g Hb	$M \pm m$ $p$	2,0 - 4,0	3,0 ± 0,2	2,5 ± 0,2 > 0,05
2,3- DPG, mcmol/g Hb	$M \pm m$ $p$	6,0 - 12,0	11 ,2 ± 1,0	10,5 ± 1,3 > 0,05
RBCs osmotic resistance, % sodium chloride	$M \pm m$ $p$	0,40	0,42 ± 0,02	0,46 ± 0,02 > 0,05
RBCs electrophoretic mobility, $\mu\text{m}\cdot\text{cm}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	$M \pm m$ $p$	1,088	0,945 ± 0,020	0,935 ± 0,040 > 0,05
Suspension viscosity factor, mPa·C	$M \pm m$ $p$	5,9	5,40 ± 0,20	5,50 ± 0,16 > 0,05
$P_{50}$ , hPa	$M \pm m$ $p$	34,7	25,5±1,6	24,1±1,3 > 0,05

Note: p – credibility of the difference of thawed RBCs indicators under research on the 7th storage day at +4 °C in comparison with indicators directly after thawing.

Taking into account the fact that RBCs osmotic resistance is a test which can be used to in vitro evaluate RBCs acceptance in patient's blood flow, we have researched the changes in this indicator depending on the storage period of RBCs at +2°C - +4°C. The studies have shown that on the 7th storage day high RBCs osmotic resistance values were observed (table 2). High osmotic resistance of thawed RBCs during 7-day storage period at +2°C - +4°C is explained by the fact that during washing process unstable cells, which are in pre-haemolytic stage and, consequently, potentially lack viability, are removed from thawed RBCs suspension.

On the 7th day of thawed RBCs storage at a temperature of +2°C–+4°C, no significant changes were observed in the viscosity coefficient of the suspension, as well as the hematocrit index (table 2). This contributed to the preservation of the normal shape of RBCs and the intact state of their membranes.

**Discussion**

The content of ATP and 2,3-DPG, indicators of viability, energy potential, oxygen transport function, in thawed RBCs on the 7th day of storage were within the normal range (table

2). The  $P_{50}$  indicator, which reflects the degree of hemoglobin affinity to oxygen, decreased on the 7th day of storage of thawed RBCs at a temperature of +2°C–+4°C (table 2), which indicated a decrease in the degree of hemoglobin affinity to oxygen and simplification of its return to the tissues. Thus, the normal level of ATP and 2,3-DPG and a decrease in the  $P_{50}$  level indicated the viability, high energy potential, and high oxygen transport capabilities of thawed RBCs on the 7th day of their storage at a temperature of +2°C–+4 °C.

In conclusions, the obtained research results showed that the use of deglycerinization of thawed RBCs, cryopreserved at -40°C, by the reverse cytoagglomeration method, as well as the use of plasma-substituting lactate-sucrose-phosphate solution for resuspension of washed RBCs make it possible to extend their storage period at a temperature of +2°C - +4 °C from 24 hours to 7 days in a functionally complete state, which can contribute to the widespread implementation of RBC cryopreservation methods in the state blood service.

Таблиця 2

**Показники морфологічного стану та функціональних можливостей  
криоконсервованих за  $-40^{\circ}\text{C}$  еритроцитів безпосередньо після розморожування  
і на 7-му добу зберігання за температури  $+2^{\circ}\text{C}$  -  $+4^{\circ}\text{C}$  ( $n = 186$ )**

Досліджувані показники	Статистичні показники	Норма	Безпосередньо після розморожування	7-й день зберігання за $+4^{\circ}\text{C}$
Гематокрит, л/л	$M$ $m$ $p$	0,36-0,46 жін 0,41-0,53 чол	$0,39 \pm 0,01$	$0,40 \pm 0,02$ > 0,05
Вільний гемоглобін, г/л	$M \pm m$ $p$	0,20-0,70	$0,35 \pm 0,03$	$0,42 \pm 0,02$ > 0,05
Позаклітинний калій, ммоль/л	$M \pm m$ $p$	1,2-8,9	$1,7 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,4$ > 0,05
АТФ, мкмоль/г Hb	$M \pm m$ $p$	2,0 - 4,0	$3,0 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,2$ > 0,05
2,3-ДФГ, мкмоль/г Hb	$M \pm m$ $p$	6,0 - 12,0	$11,2 \pm 1,0$	$10,5 \pm 1,3$ > 0,05
Осмотична стійкість еритроцитів, % натрію хлориду	$M \pm m$ $p$	0,40	$0,42 \pm 0,02$	$0,46 \pm 0,02$ > 0,05
Електрофоретична рухливість еритроцитів, $\text{мк}\cdot\text{см}\cdot\text{в}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$	$M \pm m$ $p$	1,088	$0,945 \pm 0,020$	$0,935 \pm 0,040$ > 0,05
В'язкість, мПа·с	$M \pm m$ $p$	5,9	$5,40 \pm 0,20$	$5,50 \pm 0,16$ > 0,05
$P_{50}$ , гПа	$M \pm m$ $p$	34,7	$25,5 \pm 1,6$	$24,1 \pm 1,3$ > 0,05

Примітка:  $p$  – достовірність різниць досліджуваних показників розморожених еритроцитів на 7-му добу зберігання за  $+2^{\circ}\text{C}$  -  $+4^{\circ}\text{C}$  порівняно з показниками безпосередньо після розморожування.

татно-сахарозо-фосфатного розчину для їх ресуспендування забезпечило високий вихід  $94,4 \pm 0,5\%$  відновлених повноцінних клітин після їх зберігання впродовж 7 діб за температури  $+2^{\circ}\text{C}$ – $+4^{\circ}\text{C}$ .

З метою визначення інтактності клітинних мембран розморожених еритроцитів залежно від строку зберігання за температури  $+2^{\circ}\text{C}$ – $+4^{\circ}\text{C}$  досліджено їхню електрофоретичну рухомість (ЕФР). Дослідження виявило, що на 7-му добу зберігання ЕФР розморожених еритроцитів була в межах норми (табл.2). Отримані результати свідчили про відсутність змін мембран розморожених еритроцитів впродовж 7-ми діб зберігання за температури  $+2^{\circ}\text{C}$ – $+4^{\circ}\text{C}$ .

Враховуючи те, що осмотична стійкість еритроцитів є тестом, за допомогою якого *in vitro* можливо оцінити приживлення еритроцитів у кров'яному руслі реципієнта, ми дослідили зміни цього показника залежно від строку зберігання розморожених еритроцитів за температури  $+2^{\circ}\text{C}$ – $+4^{\circ}\text{C}$ . Дослідження виявили, що на 7-му добу зберігання спостерігалися високі показники осмотичної стійкості еритроцитів (табл.2). Висока осмо-

тична стійкість розморожених еритроцитів впродовж 7-ми діб зберігання за температури  $+2^{\circ}\text{C}$ – $+4^{\circ}\text{C}$  пояснюється тим, що під час відмивання з зависі розморожених еритроцитів видаляються клітини не стійкі, які перебувають у перед гемолітичній стадії і тому потенційно нежиттєздатні.

На 7-му добу зберігання розморожених еритроцитів за температури  $+2^{\circ}\text{C}$ – $+4^{\circ}\text{C}$  не спостерігалось суттєвих змін в коефіцієнті в'язкості зависі, а також показника гематокриту (табл.2). Це сприяло збереженню нормальної форми еритроцитів та інтактного стану їхніх мембран.

### Обговорення

Вміст АТФ і 2,3-ДФГ, показників життєздатності, енергетичного потенціалу, киснево-транспортної функції, в розморожених еритроцитах на 7-му добу зберігання були в межах норми (табл.2). Показник  $P_{50}$ , який віддзеркалює ступінь спорідненості гемоглобіну до кисню, на 7-му добу зберігання розморожених еритроцитів за температури  $+2^{\circ}\text{C}$ – $+4^{\circ}\text{C}$  зменшився (табл.2), що свідчило про зниження ступеня спорідненості гемоглобіну до кисню, спрощення віддачі

## References

1. Bohonek M. Cryopreservation of blood. In: Kochhar PK, editor. Blood transfusion in clinical practice. InTech. 2012. P. 233–242.
2. D'Alessandro A., Liunbruno G. Personalised Transfusion Medicine. Blood Transfusion. 2019. No. 4. P.19–23.
3. Dilek Unal, Yesim Senayli, Reyhan Polat et al. Peri-operative blood transfusion in elective major surgery: incidence, indications and outcome – an observational multicenter study. Blood Transfusion. 2020. No. 4. P.61–63.
4. Hampton D.A, Wiles C., Fabricant L.J., et al. Cryopreserved red blood cells are superior to standard liquid red blood cells. J Trauma. 2014. No. 77. P. 20–27.
5. Henkelman S., Noorman F., Badloe J. F. Utilization and quality of cryopreserved red blood cells in transfusion medicine. Vox Sang. 2015. 108, No. 2. P. 103–112.
6. Schreiber M.A., McCully B.H., Holcomb J.B., et al. Transfusion of cryopreserved packed red blood cells is safe and effective after trauma: a prospective randomized trial. Ann Surg. 2015. No. 252. P.426–433.
7. Yoshida T, Prudent M, D'alessandro A. Red blood cell storage lesion: causes and potential clinical consequences. Blood Transfus. 2019 Jan.17, No. 1. P.27–52. DOI: 10.2450/2019.0217-18.
8. Chechetkin A. V., Bessmeltsev S. S., Volkova S. D., Kirianova G. Yu., Grishina G. V. Red blood cells cryopreservation at moderately low temperatures and prolonged storage after thawing in blood service facilities: Metodicheskiye rekomendatsyyi. St.Petersburg, FMBA Rossiya. Agency «ViT-print». 2020. 24 p.
9. Fuller B., Grin K., Grishchenko V.I. Cryopreservation for cell banks: modern concepts on the turn of the 21 century. Problemy kriobiologii. 2003. No. 2. P. 62–84.
10. Gordon N.T., Schreiber M.A. Frozen blood and lessons learned from 9/11. J Trauma. 2014. No. 77. P.479–485.
11. Vidyborets S.V., Gaidukova S.M., Kovalkina L.A. The state of usage of cryopreserved transfusion ways in clinical practice as reflection of modern transfusiology and cryobiology issues in Ukraine. Problemy kriobiologii. 2005. 15, No. 3. P. 524–526.
12. Vysochyn I.V., Kobzeva Ye.N., Makarov M.S., Glukhov A.S., Tiurin I.A., Kliuyev A.Ye., Khvatov V.V. Procurement and clinical usage of cryopreserved red blood cells and platelets. Almanakh klinicheskoi meditsyny. <https://doi.org/10.18786/2072-0505-2014-30-70-75>
13. Vinograd-Finkel F.R., Fedorova L.I., Semenova N.V. Viability of red blood cells stored for 12–15 years at –196°C. Problemy gematologii. 1980, No. 1. P. 8–11.
14. Hvozdiuk Ya.V., Chekanova V.V., Pakhomova Yu.S., Kompaniets A.M. Physical and chemical properties and protective action of polyvinyl alcohol solution, glycerol solution and environments based on their combinations during red blood cells freezing. – Problemy kriobiologii and kriomeditsyny. 2020. 30, No. 3. P.288.
15. Kyrianova G.Yu., Volkova S.D., Kasianov A.D., Grishina G.V., Golovanova I.S., Chechetkin A.V. Red blood cells cryopreservation at –40°C and –80°C. Vestnik mezhdunarodnoi akademiyi kholoda. 2017. No. 1. P.72–80.
16. Kyrianova G.Yu., Volkova S.D., Grishina G.V. Prolonged storage of thawed red blood cells at 4°C in cryoprotective solution prior washing. Transfusiologiya. 2017. 18, No. 4. P. 18–29.
17. Lelkens C., Korte D., Lagerberg J. W. Prolonged post-thaw shelf life of red cells frozen without prefreeze removal of excess glycerol. Vox Sang. 2015. 108, No. 3. P. 219–225.
18. Ramazanov V., Semenchenko A., Rudenko S. Recovery of cryopreserved RBCs morphology. Aktualni problem suchasnoyi meditsyny: Visnyk ukrayinskoyi medychnoyi stomatologichnoyi akademiyi. 2021, No. 1 P.101–108. <https://doi.org/10.31718/2077-1096.21.1.101>.
19. The Law of Ukraine “On Safety and Quality of Donor Blood and its Components” No. 931-IX as of 25.01.2021.
20. <https://medlec.org/lek3-529.html> 2015-09-27 (blood viscosity).
21. Osmotic resistance of erythrocytes: method of determination. zdorovia. 2021. No. 6. P. 11–12.
22. Nykyforova O.A. Effect of stressful conditions on the functional state of blood eritroid cells. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology. Ecology. 2011. Vol. 19, N 2. P. 109–113.
23. Dubivska S. Value of 2,3-diphosphoglycerate as an indicator of hypoxia that influences the course of postoperative cognitive dysfunction. Visnyk of Problems of Biology and Medicine. – 2020. – Vol. 1 (155). – P. 128–131.
24. Kucherenko I.S., Soldatkin O.O., Didukh D.Yu., Soldatkin O.P. Characteristics and optimal operating conditions of the amperometric biosensor for the determination of adenosine triphosphoric acid. 2014. Vol. 7. P. 66 – 74.
25. Goriachkovskiy A.M. Clinical biochemistry in laboratory diagnostics. Odessa. Eckologia. 2005. P.116–123.

його тканинам. Отже, нормальний рівень показників АТФ і 2,3-ДФГ на фоні зниження показника  $P_{50}$ , засвідчило життєздатність, високий енергетичний потенціал, високі киснево-транспортні можливості розморожених еритроцитів на 7-му добу їх зберігання за температури  $+2^{\circ}\text{C}$ – $+4^{\circ}\text{C}$ .

У висновках: отримані результати досліджень засвідчили, що застосування дегліцеринізації розморожених еритроцитів, кріо-

консервованих за  $-40^{\circ}\text{C}$ , методом зворотної цитагломерації, а також застосування плазмозамінного лактатно-сахарозо-фосфатного розчину для ресуспендування відмитих еритроцитів дають змогу продовжити строк їх зберігання за температури  $+2^{\circ}\text{C}$  -  $+4^{\circ}\text{C}$  з 24 годин до 7 діб у функціонально повноцінному стані, що може сприяти широкому впровадженню методів кріоконсервування еритроцитів в службі крові країни.

### Список літератури

1. Bohonek M. Cryopreservation of blood. In: Kochhar PK, editor. Blood transfusion in clinical practice. InTech. 2012. P. 233–242.
2. D'Alessandro A., Liunbruno G. Personalised Transfusion Medicine. Blood Transfusion. 2019. No. 4. P.19-23.
3. Dilek Unal, Yesim Senayli, Reyhan Polat et al. Peri-operative blood transfusion in elective major surgery: incidence, indications and outcome – an observational multicenter study. Blood Transfusion. 2020. No. 4. P.61-63.
4. Hampton D.A, Wiles C., Fabricant L.J., et al. Cryopreserved red blood cells are superior to standard liquid red blood cells. J Trauma. 2014. No. 77. P. 20–27.
5. Henkelman S., Noorman F., Badloe J. F. Utilization and quality of cryopreserved red blood cells in transfusion medicine. Vox Sang. 2015. 108, No. 2. P. 103–112.
6. Schreiber M.A., McCully B.H., Holcomb J.B., et al. Transfusion of cryopreserved packed red blood cells is safe and effective after trauma: a prospective randomized trial. Ann Surg. 2015. No. 252. P.426–433.
7. Yoshida T, Prudent M, D'alessandro A. Red blood cell storage lesion: causes and potential clinical consequences. Blood Transfus. 2019 Jan.17, No. 1. P.27-52. DOI: 10.2450/2019.0217-18.
8. Chechetkin A. V., Bessmeltsev S. S., Volkova S. D., Kirianova G. Yu., Grishina G. V. Red blood cells cryopreservation at moderately low temperatures and prolonged storage after thawing in blood service facilities: Metodicheskiye rekomendatsyyi. St.Petersburg, FMBA Rossiya. Agency «ViT-print». 2020. 24 p.
9. Fuller B., Grin K., Grishchenko V.I. Cryopreservation for cell banks: modern concepts on the turn of the 21 century. Problemy kriobiologii. 2003. No. 2. P. 62-84.
10. Gordon N.T., Schreiber M.A. Frozen blood and lessons learned from 9/11. J Trauma. 2014. No. 77. P.479–485.
11. Vydyborets S.V., Gaidukova S.M., Kovalkina L.A. The state of usage of cryopreserved transfusion ways in clinical practice as reflection of modern transfusiology and cryobiology issues in Ukraine. Problemy kriobiologii. 2005. 15, No. 3. P. 524-526.
12. Vysochyn I.V., Kobzeva Ye.N., Makarov M.S., Glukhov A.S., Tiurin I.A., Kliuyev A.Ye., Khvatov V.V. Procurement and clinical usage of cryopreserved red blood cells and platelets. Almanakh klinicheskoi meditsyny. <https://doi.org/10.18786/2072-0505-2014-30-70-75>
13. Vinograd-Finkel F.R., Fedorova L.I., Semenova N.V. Viability of red blood cells stored for 12-15 years at  $-196^{\circ}\text{C}$ . Problemy gematologii. 1980, No. 1. P. 8-11.
14. Hvozdiuk Ya.V., Chekanova V.V., Pakhomova Yu.S., Kompaniets A.M. Physical and chemical properties and protective action of polyvinyl alcohol solution, glycerol solution and environments based on their combinations during red blood cells freezing. – Problemy kriobiologii and kriomeditsyny. 2020. 30, No. 3. P.288.
15. Kyrianova G.Yu., Volkova S.D., Kasianov A.D., Grishina G.V., Golovanova I.S., Chechetkin A.V. Red blood cells cryopreservation at  $-40^{\circ}\text{C}$  and  $-80^{\circ}\text{C}$ . Vestnik mezhdunarodnoi akademiyi kholoda. 2017. No. 1. P.72-80.
16. Kyrianova G.Yu., Volkova S.D., Grishina G.V. Prolonged storage of thawed red blood cells at  $4^{\circ}\text{C}$  in cryoprotective solution prior washing. Transfusiologiya. 2017. 18, No. 4. P. 18–29.
17. Leikens C., Korte D., Lagerberg J. W. Prolonged post-thaw shelf life of red cells frozen without prefreeze removal of excess glycerol. Vox Sang. 2015. 108, No. 3. P. 219–225.
18. Ramazanov V., Semenchenko A., Rudenko S. Recovery of cryopreserved RBCs morphology. Aktualni problem suchasnoyi meditsyny: Visnyk ukrayinskoyi medychnoyi stomatologichnoyi akademiyi. 2021, No. 1 P.101-108. <https://doi.org/10.31718/2077-1096.21.1.101>.
19. The Law of Ukraine "On Safety and Quality of Donor Blood and its Components" No. 931-IX as of 25.01.2021.
20. <https://medlec.org/lek3-529.html> 2015-09-27 (blood viscosity).

21. Osmotic resistance of erythrocytes: method of determination. *zdorovia*. 2021. No. 6. P. 11-12.
22. Nykyforova O.A. Effect of stressful conditions on the functional state of blood eritroid cells. *Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology. Ecology*. 2011. Vol. 19, N 2. P. 109–113.
23. Dubivska S. Value of 2.3-diphosphoglycerate as an indicator of hypoxia that influences the course of postoperative cognitive dysfunction. *Visnyk of Problems of Biology and Medicine*. – 2020. – Vol. 1 (155). – P. 128-131.
24. Kucherenko I.S., Soldatkin O.O., Didukh D.Yu., Soldatkin O.P. Characteristics and optimal operating conditions of the amperometric biosensor for the determination of adenosine triphosphoric acid. 2014. Vol. 7. P. 66 – 74.
25. Goriachkovskiy A.M. *Clinical biochemistry in laboratory diagnostics*. Odessa. *Eckologia*. 2005. P.116-123.