

Криоконсервирование тромбоцитов.**1. Разработка криоконсервантов на основе комбинаций криопротекторов и исследование их эффективности**

UDC 612.111.7:615.014.41

O.A. BOGDANCHIKOVA, A.M. KOMPANIETS*

Platelet Cryopreservation.**1. Development of Cryopreservative Solutions, Based on Cryoprotectant Combination and Study of Their Efficiency**

В работе исследована криозащитная эффективность криоконсервантов на основе комбинаций различных криопротекторов при замораживании тромбоцитов. Установлены комбинации криопротекторов: 10% диметилацетамид (ДМАЦ)/1,2-пропандиол, ДМАЦ/глицерин и ДМАЦ/ оксиэтилированный глицерин (n = 5), которые значительно повышают сохранность криоконсервированных тромбоцитов по сравнению с результатами замораживания под защитой монокриопротекторных сред, содержащих одно из перечисленных веществ, в том числе 10% диметилсульфоксида.

Ключевые слова: тромбоциты, криоконсервирование, комбинированные криозащитные среды, агрегация, реакция на гипотонический шок, ретракция тромбоцитарного сгустка.

В роботі досліджено криозахисну ефективність криоконсервантів на основі комбінацій різних криопротекторів при заморожуванні тромбоцитів. Визначено комбінації криопротекторів: 10% диметилацетамід (ДМАЦ)/1,2-пропандіол, ДМАЦ/гліцерин і ДМАЦ/оксиетильований гліцерин (n = 5), що дозволяють підвищити збереженість криоконсервованих тромбоцитів в порівнянні з результатами заморожування під захистом монокриопротекторних середовищ, що містять одну з зазначених речовин, включаючи 10% диметилсульфоксиду.

Ключові слова: тромбоцити, криоконсервування, комбіновані криозахисні середовища, агрегація, реакція на гіпотонічний шок, ретракція тромбоцитарного згустку.

Cryoprotective efficiency of cryopreservative solutions, based on combining different cryoprotectants during platelet freezing, was studied in the research. There were established the cryoprotectant combinations such as: 10% dimethyl acetamide (DMAC)/1,2-propane diol (1,2-PD), DMAC/glycerol and DMAC/oxyethylated glycerol (n = 5), significantly increasing the integrity of cryopreserved platelets, compared to the results of freezing under protection of monocryoprotective media, containing one of the mentioned above substances, including 10% dimethyl sulfoxide.

Key-words: platelets, cryopreservation, combined cryoprotective solutions, aggregation, hypotonic shock reaction, platelet clot retraction.

Трансфузии концентратов тромбоцитов (КТ) являются эффективным методом лечения и профилактики геморрагических осложнений, обусловленных снижением количества тромбоцитов (тромбоцитопения) или их дисфункцией (тромбоцитопатия) [1, 3, 6, 19, 28].

Систематическое применение трансфузий тромбоцитов, начавшееся в 60-е годы XX столетия благодаря разработке методов получения КТ с помощью пластиковых контейнеров, имело чрезвычайно важное значение для клинической медицины, поскольку впервые решало проблему купирования тромбоцитопенических геморрагий, являвшихся причиной 60–70% летальных исходов у больных с гемобластозами и депрессиями кроветворения [22, 23]. Последующие годы отмечены

Transfusions of platelet concentrates (PCs) are efficient methods in treatment and prevention of hemorrhagic complications, stipulated by either decreased platelet count (thrombocytopenia) or their dysfunction (thrombocytopathy) [1, 3, 6, 19, 28].

Systematic application of platelet transfusions, starting in the 60s of 20th century due to designing the methods for obtaining the PC in plastic containers, was of great importance for clinical medicine, since for the first time it solved the problem of thrombocytopenic hemorrhage arresting, being the cause of 60–70% lethal outcomes in patients with hemoblastoses and hemopoietic depressions [22, 23]. The following years were marked by a constant augmentation of needs of clinics in this transfusion medium and to the beginning of 21st century the number of PCs transfusions was

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* 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:
cryo@online.kharkov.ua

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

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

постоянным увеличением потребностей лечебных учреждений в этой трансфузионной среде и к началу XXI столетия число трансфузий КТ настолько возросло, что их обеспечение стало огромной нагрузкой для банков крови во всем мире [2, 11, 29]. Только в США с 1971 по 1980 годы число переливаний КТ увеличилось с 410 тыс. до 2 млн 860 тыс. в год [30], а в 2001 году составило 10 млн 196 тыс. [29]. Подобная динамика прослеживается в отчетах банков крови европейских стран.

Причины такого интенсивного роста кроются в том, что трансфузии тромбоцитов позволили не только значительно снизить летальность, обусловленную тромбоцитопеническим геморрагическим синдромом у больных с различной патологией (гемобластозы, апластическая анемия, злокачественные новообразования, лучевая болезнь и т. д.), но и сделали возможным проведение в полном объеме противоопухолевой терапии, в том числе в период выраженной депрессии кроветворения; способствовали разработке и совершенствованию интенсивных лечебных программ в гематологии, онкологии, трансплантологии; проведению оперативных вмешательств в сердечно-сосудистой хирургии, ортопедии, травматологии и т. д. [3, 6, 26, 33, 34].

Тем не менее, и в наши дни проведение трансфузии КТ, особенно в экстренных случаях, сопряжено с определенными трудностями, в первую очередь, из-за отсутствия эффективных методов их долгосрочного хранения. В связи с широким использованием переливания тромбоцитов возникли серьезные проблемы: развитие аллоиммунизации и рефрактерности больных к трансфузиям КТ, риск передачи опасных гемотрансмиссивных инфекций (вирусные гепатиты, ВИЧ и др.), развитие трансфузионных реакций и осложнений [10, 13, 25, 27]. Решению этих проблем могли бы способствовать криоконсервирование и долгосрочное хранение тромбоцитов, которые позволили бы при необходимости проводить дополнительное обследование на наличие возбудителей инфекционных заболеваний, исключить возможность бактериальной контаминации при хранении, создать банки аутологичных, а также HLA- и HPA-типированных аллогенных тромбоцитов, транспортировать КТ на большие расстояния и т. д. [28, 33, 34].

Работы по созданию методов криоконсервирования тромбоцитов для клинической практики, ведущиеся уже около 50 лет, оказались не столь успешными, как других клеток и тканей. В настоящее время существуют методы замораживания КТ с криопротекторами диметилсульфоксидом (ДМСО) [2, 14, 31, 32], диметилацетамидом (ДМАЦ) [1, 3], глицерином [8, 14, 31], 1,2-пропандиолом (1,2-ПД) [3, 5, 8, 15]. В качестве криопротекто-

such increased, that their providing became a huge charge for blood banks around the world [2, 11, 29]. Only in the USA from 1971 to 1980 the number of PC transfusion augmented from 410 thousand to 2 million 860 thousand per year [30], but in 2001 it made 10 million 196 thousand [29]. The same dynamics is traced in the reports of European blood banks.

The reasons of such an intensive growth are in the fact, that platelet transfusions enabled not only to significantly decrease the lethality, stipulated by thrombocytopenic hemorrhagic syndrome in patients with different pathology (hemoblastoses, aplastic anemia, malignant neoplasms, radiation sickness, *etc.*), but made it possible to perform a full-scale antitumoral therapy, including the period of manifested hemopoietic depression as well; contributed to the designing and optimising of intensive treatment programs in hematology, oncology, transplantology; performance of cardiovascular, orthopedic and traumatological surgeries, *etc.* [3, 6, 26, 33, 34].

However, nowadays the performance of PC transfusion, especially in case of emergency is associated to certain complications, first of all, because of the absence of any efficient methods for their long-term storage. Due to the wide utilisation of platelet transfusion a serious problems arise such as: development of patients' alloimmunisation and refractoriness to PC transfusions, the risk to transmit dangerous hemotransmissible infections (viral hepatitis, HIV *etc.*), development of transfusion reactions and complications [10, 13, 25, 27]. Cryopreservation and long-term storage of platelets, which would enable, if necessary, to perform an additional examination for the presence of infectious agents; to exclude the possibility of bacterial contamination during storage; to establish banks of autologous, as well as HLA- and HPA-matched allogenic platelets; to transport PCs for long distances *etc.*, might contribute to solve these problems [28, 33, 34].

The researches on designing the methods for platelet cryopreservation in clinical practice, being implemented nearly within 50 years, occurred to be not so successful as for the other cells and tissues. Nowadays there are the methods of PCs' freezing with dimethyl sulfoxide (DMSO) [2, 14, 31, 32], dimethyl acetamide (DMAC) [1, 3], glycerol [8, 14, 31], 1,2-propane diol (1,2-PD) [3, 5, 8, 15] cryoprotectants. As cryoprotectants were studied many other compounds, including non-penetrative ones: dextran, hydroxyethylated starch [31] *etc.* However the cryopreserved platelets do not find a wide application in medical practice because of their low therapeutic efficiency (30–40% of corresponding index for fresh PCs) [1, 26, 33, 34].

However, the interest of researchers to this complicated problem has significantly increased [15, 22], but still focused to optimising conditions for platelet freezing

ров исследованы многие другие соединения, в том числе непроникающие – декстран, гидроксипропилированный крахмал [31] и т. д. Однако криоконсервированные тромбоциты не находят широкого применения в лечебной практике из-за их низкой лечебной эффективности (30–40% от соответствующего показателя для свежевыделенных КТ) [1, 26, 33, 34].

Вместе с тем интерес исследователей к этой сложной проблеме значительно повышается [15, 22], хотя по-прежнему в основном сконцентрирован на оптимизации условий замораживания тромбоцитов с ДМСО – “золотым стандартом” методов криоконсервирования КТ [17, 21, 33].

Анализ многочисленных публикаций и наш опыт работы позволяют прийти к заключению, что возможности оптимизации результатов криоконсервирования КТ на основании применения какого-то одного из криопротекторов, по-видимому, себя исчерпали [4, 21].

Цель исследования – разработка криоконсервантов для замораживания тромбоцитов на основе комбинаций различных криопротекторов, исследование их цитотоксичности и криозащитной эффективности.

Материалы и методы

Концентрат тромбоцитов для исследований выделяли из отдельных доз донорской крови, заготовленной на консерванте “Глюгидир”, методом из лейкотромбоцитарного слоя с использованием рефрижераторных центрифуг и системы пластиковых контейнеров (“Гемакон” и “Компопласт”) [3]. Донорскую кровь до выделения КТ хранили в течение 8–10 ч при температуре 20°C до получения результатов обследования дозы на наличие инфекций. Перед проведением исследований по криоконсервированию КТ сохраняли при 22±2°C в течение 12–16 ч при постоянном перемешивании на автоматической мешалке со скоростью 2 об/мин.

В работе использованы криопротекторы ДМСО, ДМАЦ, 1,2-ПД, глицерин и оксиэтилированный глицерин со степенью полимеризации $n=5$ (ОЭГ $n=5$), очищенные и идентифицированные в ИПКиК НАН Украины.

Исследование влияния ограждающих растворов на функциональные свойства тромбоцитов на этапе экспозиции проведено с растворами, содержащими следующие комбинации криопротекторов: ДМАЦ/1,2-ПД, ДМАЦ/ОЭГ $n=5$, ДМАЦ/глицерин, 1,2-ПД/глицерин, 1,2-ПД/ОЭГ $n=5$ (5, 10 и 15%-е начальные суммарные концентрации криопротекторов в плазме при их соотношении 1:1), а также растворы, содержащие 10%-е концентрации вышеперечисленных комбинаций криопротекторов в

with DMSO, the “golden standard” of PCs cryopreservation methods [17, 21, 33].

Analysis of numerous publications and our experience enable concluding about the fact, that the possibilities to optimise the results of PCs cryopreservation, based on applying one of cryoprotectants, probably exhausted themselves [4, 21].

The aim of research was to develop the cryopreservative solutions for platelet freezing, based on combining different cryoprotectants, study of their cytotoxicity and cryoprotective efficiency.

Materials and methods

Platelet concentrate for research was isolated from separated doses of donor blood, collected in “Glygicir” anticoagulant, by buffy-coat method, using refrigerate centrifuges and system of plastic containers (“Hemakon”, “Kompoplast”) [3]. Donor blood prior to PCs isolation was stored within 8–10 hrs at 20°C up to obtaining results of dose examination for infection presence. Before performing researches on cryopreservation, the PCs were stored at 22±2°C within 12–16 hrs at a constant mixing with automatic agitator with 2 rot/min rate.

DMSO, DMAC, 1,2-PD, glycerol and oxyethylated glycerol with polymerisation degree $n=5$ (OEG $n=5$), purified and identified at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, were used in the research.

The effect of protective solutions on platelet functional properties at the exposure stage was studied using the solutions, containing the following combinations of cryoprotectants: DMAC/1,2-PD, DMAC/OEG $n=5$, DMAC/glycerol, 1,2-PD/glycerol, 1,2-PD/OEG $n=5$ (5, 10 and 15% initial total cryoprotectant concentrations in plasma at the ratio 1:1), as well as the solutions, comprising 10% concentrations of the mentioned above combinations in 1:3 and 3:1 ratio. Exposure time of PCs samples with solutions was 15, 30 and 60 min.

During PCs freezing there were studied the cryoprotective solutions of following composition: DMAC/1,2-PD, DMAC/OEG $n=5$, DMAC/glycerol, 1,2-PD/glycerol, 1,2-PD/OEG $n=5$ (5, 10 and 15% total cryoprotectant concentrations in plasma). The studied solutions under a constant agitating were slowly mixed with PCs samples in 1:1 ratio, the exposure time before freezing was 15, 30 and 60 min. In order to additionally control the efficiency of combined cryoprotective solutions, the PCs samples were frozen in a parallel way with DMSO, DMAC, 1,2-PD, glycerol and OEG $n=5$, 10% cryoprotectant concentration in plasma after 30 min exposure.

Platelet concentrates were frozen in rectangular polymer containers (on fluoroplastic base) (30×100 mm size, 10 ml capacity). Containers with PCs samples were placed horizontally on a foam platform, situated

соотношении 1:3 и 3:1. Время экспозиции образцов КТ с растворами – 15, 30 и 60 мин.

При замораживании КТ исследованы ограждающие растворы следующего состава: ДМАЦ/1,2-ПД, ДМАЦ/ОЭГ $n=5$, ДМАЦ/глицерин, 1,2-ПД/глицерин, 1,2-ПД/ОЭГ $n=5$ (5, 10 и 15%-е суммарные концентрации криопротекторов в плазме). Исследуемые растворы медленно при постоянном перемешивании смешивали с образцами КТ в соотношении 1:1, время экспозиции перед замораживанием – 15, 30 и 60 мин. Для дополнительного контроля эффективности комбинированных ограждающих растворов образцы КТ параллельно замораживали с ДМСО, ДМАЦ, 1,2-ПД, глицерином и ОЭГ $n=5$: концентрация криопротекторов в плазме составляла 10%, экспозиция – 30 мин.

Образцы КТ замораживали в полимерных контейнерах (на основе фторопласта) прямоугольной формы (размеры 30×100 мм, вместимость 10 мл). Контейнеры с образцами КТ размещали горизонтально на пенопластовой платформе, расположенной на поверхности азота, выдерживали на платформе 15 мин, затем погружали в жидкий азот.

Изменение температуры в замораживаемых образцах КТ определяли с помощью медь-константановой термопары, рассчитанная скорость охлаждения на разных этапах – от 16 до 30°C/мин. Контейнеры с замороженными образцами КТ хранили в жидком азоте от 24 ч до 1 года.

Образцы отогревали на водяной бане при 37°C при постоянном покачивании.

После размораживания подсчитывали количество восстановленных тромбоцитов в образцах [10]. Сохранность функциональной активности криоконсервированных КТ оценивали после удаления криопротекторов из суспензии тромбоцитов методом [12] по следующим параметрам *in vitro*: реакция на гипотонический шок (РГШ) [3], АДФ- и коллаген-индуцированная агрегация (фотометрический метод) [18], ретракция сгустка. Полученные результаты измерений выражали в процентном соотношении к соответствующим показателям для свежевыделенных КТ.

Величины РГШ и агрегации измеряли на анализаторе “Colysagraph” (США) с графической регистрацией процесса на самописце “Endim” 622.01 (Германия). В работе использовали следующие индукторы агрегации: растворы АДФ (конечная концентрация 200 мкМ, “Serva”, США) и коллагена (конечная концентрация 20 мг/мл, “Технология-СТАНДАРТ”, Беларусь).

Ретракцию тромбоцитарного сгустка определяли следующим образом: к 1 мл суспензии тромбоцитов, содержащей 1×10^5 /мкл, вводили 0,1 мл 5%-го CaCl_2 , тщательно перемешивали и помещали в термостат (37°C). Через 1 ч измеряли объем

on nitrogen surface, exposed for 15 min on platform, then immersed into liquid nitrogen.

Temperature change in PCs frozen samples was determined using a copper-constantan thermocouple, the calculated cooling rate at various stages was from 16 to 30°C/min. Containers with PCs frozen samples were stored in liquid nitrogen from 24 hrs to 1 year.

Samples were thawed on water bath at 37°C at a constant shaking.

After freeze-thawing the number of recovered platelets in samples was calculated [10]. The integrity of functional activity of cryopreserved PCs was estimated after cryoprotectant removal from platelet suspension according to the method [12] by the following parameters *in vitro*: hypotonic shock reaction (HSR) [3], ADP- and collagen-induced aggregation (photometric method) [18], clot retraction. The obtained measurement results were expressed in percentage to the corresponding indices for fresh PCs.

HSR and aggregation values were measured with “Colysagraph” analyser (USA) with graphic registering of process with “Endim” 622.01 plotter (Germany). The following aggregation inducers such as: ADP (200 μM final concentration, “Serva”) and collagen solutions (20 mg/ml final concentration, “Tekhnologiya-STAN-DART”, Belarus), were used in the research.

Platelet clot retraction was determined as follows: 0.1 ml 5% CaCl_2 was injected to 1 ml of suspension, containing $1 \times 10^5/\mu\text{l}$ platelet, thoroughly mixed and placed into thermostat (37°C). The retracted plasma volume was measured in 1 hr. Retractable activity was manifested in percentage ratio of retracted plasma volume to total volume of studied platelet suspension (1.1 ml).

Obtained results were statistically processed with Microsoft Excel software using Student criterion.

Results and discussion

Extreme platelet sensitivity to different effects, especially to the one of chemical substances, significantly limits the cryoprotectant range and that of their concentrations, used under freezing. Despite all the cryoprotectants, involved in the research, are studied in details [1, 2, 4, 7, 14, 15, 17, 31], this is complicated to forecast the platelet integrity after exposure with the solutions, containing the combinations of compounds with different chemical origin (amides, polyols), differing by physical and chemical parameters, penetration rate through cell membrane, *etc.*

In order to estimate the effect character of combined cryoprotective solutions on platelet functional properties at the exposure stage there were selected two parameters: platelet aggregation degree, induced by ADP and collagen and HSR value. These parameters are informative and adequate criteria, indirectly characterising the integrity of hemostatic function of

ретрагированной плазмы. Ретракильную активность выражали в процентном соотношении объема ретрагированной плазмы к общему объему исследуемой взвеси тромбоцитов (1,1 мл).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы Microsoft Excel с применением критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Чрезвычайная чувствительность тромбоцитов к разным воздействиям, особенно к действию химических веществ, существенно ограничивает спектр криопротекторов и диапазон их концентраций, используемых при замораживании. И хотя все задействованные в работе криопротекторы детально изучены [1, 2, 4, 7, 14, 15, 17, 31], сложно спрогнозировать сохранность тромбоцитов после экспозиции с растворами, содержащими комбинации соединений различной химической природы (амиды, полиолы), отличающиеся физико-химическими параметрами, скоростью проникновения через клеточную мембрану и др.

Для оценки характера воздействия комбинированных растворов криопротекторов на функциональные свойства тромбоцитов на этапе экспозиции выбраны два параметра: степень агрегации тромбоцитов, индуцированная АДФ и коллагеном, и величина РГШ. Эти параметры являются информативными и адекватными критериями, косвенно характеризующими сохранность гемостатической функции тромбоцитов (агрегация) и их способность циркулировать в кровяном русле после переливания (РГШ) [20].

Установлено, что в результате экспозиции образцов КТ с исследуемыми растворами криопротекторов показатели агрегации и РГШ тромбоцитов снижаются (табл. 1 и 2). Степень их изменения определяется концентрацией криопротекторов и временем экспозиции с ними. Так, после 15 и 30-минутной экспозиции образцов КТ с 5%-ми концентрациями криопротекторов в растворах снижение величины агрегации и РГШ было недостоверным по сравнению со свежeweделенными тромбоцитами. Значительное уменьшение величины исследуемых параметров было получено для 15%-х концентраций криопротекторов в растворах, а также для всех исследуемых концентраций криопротекторов при времени экспозиции 60 мин. Наименьшее влияние на показатели агрегации оказывали растворы, содержащие комбинацию 1,2-ПД/глицерина, кроме того, отмечена активация агрегации тромбоцитов после экспозиции с данной средой (табл. 1).

Оценка влияния различных соотношений криопротекторов в комбинированных растворах (1:1, 3:1 и 1:3, суммарная концентрация криопротекторов 10%) на показатели агрегации и РГШ после 30-ми-

platelets (aggregation) and their capability to circulate in blood after transfusion (HSR) [20].

As a result of PCs samples' exposure with the studied cryoprotective solutions the indices of platelet aggregation and HSR were established to reduce (Table 1 and 2). The extent of their change is determined by cryoprotectant concentration and exposure time with them. Thus, after 15 and 30 min exposure of PCs samples with 5% cryoprotectant concentrations in solutions a decrease in aggregation and HSR values was statistically insignificant compared to the freshly isolated platelets. A significant reduction of the value of studied parameters was obtained for 15% cryoprotectant concentrations in solutions, as well as for all the studied cryoprotectant concentrations at 60 min exposure time. The solutions, containing 1,2-PD/glycerol combination, caused the lowest effect on aggregation indices, in addition there was noted the activation of platelet aggregation after exposure with this medium (Table 1).

The estimation of different cryoprotectant ratio effect in combined solutions (1:1, 3:1 and 1:3, 10% total concentration of cryoprotectants) on the aggregation and HSR indices after 30 min exposure enabled establishing the tendency to decrease in these parameters when augmenting DMAC and OEG n=5 concentrations in solutions up to 7.5% (Fig. 1). The data obtained testify to the fact, that DMAC and OEG n=5 significantly contribute to suppressing the platelet functional activity, as for glycerol, it occurs in a less extent and quite insignificant changes proceed under 1,2-PD effect.

When comparing the data obtained with the results of studying the effect of some cryoprotectants (DMAC, 1,2-PD, glycerol, OEG n=5 etc.) on aggregation, HSR and other parameters of platelet morphofunctional integrity at exposure stage [4, 5, 7, 8], the cryoprotectant combination in cryoprotective solution was noted as not potentiating their toxic effect on the studied parameters.

Cryoprotective efficiency of combined solutions under platelet freezing was estimated by the complex of viability criteria *in vitro*: platelet number in a sample, indices of aggregation, HSR and platelet clot retraction.

High level of platelet number recovery in PCs samples after freeze-thawing was provided by the following solutions: DMAC/1,2-PD, DMAC/glycerol and DMAC/OEG n=5 (Table 3). For the solutions, containing the combination of 1,2-PD/glycerol and 1,2-PD/OEG n=5 there were found out the significant losses in blood platelets after freeze-thawing.

The highest integrity level of ADP- and collagen-induced aggregation, HSR and platelet clot retraction indices was obtained when freezing PCs with the solutions, containing DMAC/1,2-PD, DMAC/glycerol and DMAC/OEG n=5 combinations in 10% total

Таблица 1. Агрегация тромбоцитов после экспозиции с растворами, содержащими комбинации криопротекторов, $M \pm \sigma$, $n=5$

Table 1. Platelet aggregation after exposure with solutions, containing cryoprotectant combinations, $M \pm \sigma$, $n=5$

Состав криозащитного раствора Composition of cryoprotective solution	Суммарная концентрация криопротекторов, % Total concentration of cryoprotectants, %	Агрегация, % Aggregation, %					
		АДФ (200 мкМ) ADP (200 μM)			Коллаген (20 мг/мл) Collagen (20 mg/ml)		
		Время экспозиции, мин Exposition time, min					
		15	30	60	15	30	60
ДМСО DMSO	5	94±5	90±6*	82±11*	95±6	93±6	89±13*
	10	91±10	87±8	81±8*	94±5	91±8	84±9*
	15	79±5*	79±7*	75±5*	84±7	83±12*	75±10*
ДМАЦ/1,2-ПД DMAC/1,2-PD	5	94±7	95±8	88±8	94±7	96±7	91±8
	10	96±6	97±8	89±13	97±9	97±8*	82±4*
	15	85±6*	83±9*	77±9*	88±8	87±9	79±6*
ДМАЦ/глицерин DMAC/glycerol	5	94±5	90±9	83±8*	93±4	91±10	79±3*
	10	90±6	85±7*	77±6*	91±7	90±8	84±3*
	15	85±6*	80±6*	72±6*	85±4*	80±4*	72±11*
ДМАЦ/ОЭГ n=5 DMAC/OEG n=5	5	94±7	92±7	80±6*	94±7	92±6	82±8*
	10	90±4*	94±7	77±9*	91±8,0	92±9	81±11
	15	80±7*	76±9*	68±7*	83±5*	78±7*	68±9*
1,2-ПД/глицерин 1,2-PD/glycerol	5	97±4	101±10	94±6	97±7	102±9	90±4*
	10	98±7	103±8	93±3*.#	95±10	109±11 #	90±11
	15	93±10	96±12	85±6*.*	97±8	99±13	89±9
1,2-ПД/ОЭГ n=5 1,2-PD/OEG n=5	5	90±5	91±9	88±8*	95±4	94±4	87±11
	10	91±6	92±5*	83±2*	94±7	92±6	87±7*
	15	87±5*	80±7*	79±8*	88±7	87±9	82±7*

Примечания: * – отличия статистически достоверны по сравнению с соответствующим показателем для свежеевыделенных КТ, $p < 0,05$; # – отличия статистически достоверны по сравнению с соответствующим показателем для ДМСО, $p < 0,05$.

Notes: * – differences are statistically significant compared to the corresponding index for fresh PCs, $p < 0.05$; # – differences are statistically significant compared to the corresponding index for DMSO, $p < 0.05$.

нутной экспозиции позволила установить тенденцию к снижению этих параметров при увеличении концентраций ДМАЦ и ОЭГ $n=5$ в растворах до 7,5% (рис. 1). Полученные данные свидетельствуют о том, что значительный вклад в подавление функциональной активности тромбоцитов вносят ДМАЦ и ОЭГ $n=5$, в меньшей степени – глицерин, незначительно – 1,2-ПД.

При сравнении полученных данных с результатами изучения влияния отдельных криопротек-

concentration (Fig. 2 and 3). Combined solutions with 5% total cryoprotectant concentration are characterised by a low level of cryoprotective effect, insufficient for PCs freezing. With an increase in a total cryoprotective concentration in DMAC/1,2-PD and DMAC/glycerol solutions up to 15%, the level of PCs samples' integrity augmented, compared to the data for 5% solutions. The results of PCs integrity for 15% DMAC/OEG $n=5$ are statistically and significantly lower, than the ones for PCs freezing with 10% con-

торов (ДМАЦ, 1,2-ПД, глицерин, ОЭГ n=5 и др.) на агрегацию, РГШ и другие параметры морфофункциональной полноценности тромбоцитов на этапе экспозиции [4, 5, 7, 8] отмечено, что сочетание криопротекторов в ограждающих растворах не потенцирует их токсическое действие на исследуемые параметры.

Криозащитную эффективность комбинированных растворов при замораживании тромбоцитов оценивали по комплексу критериев *in vitro* жизнеспособности: количество тромбоцитов в образце, показатели агрегации, РГШ и ретракции тромбоцитарного сгустка.

Высокий уровень восстановления количества тромбоцитов в образцах КТ после размораживания обеспечивали растворы: ДМАЦ/1,2-ПД, ДМАЦ/глицерин и ДМАЦ/ОЭГ n=5 (табл. 3). Для растворов, содержащих комбинацию криопротекторов 1,2-ПД/глицерин и 1,2-ПД/ОЭГ n=5 выявлены значительные потери кровяных пластинок после размораживания.

Наиболее высокий уровень сохранности показателей АДФ- и коллаген-индуцированной агрегации, РГШ и ретракции тромбоцитов получен при замораживании КТ с растворами, содержащими комбинации ДМАЦ/1,2-ПД, ДМАЦ/глицерин и ДМАЦ/ОЭГ n=5 в 10%-й суммарной концентрации (рис. 2 и 3). Комбинированные растворы с 5%-й суммарной концентрацией криопротекторов, характеризуются низким уровнем криозащитного действия, недостаточным для замораживания КТ. С увеличением суммарной концентрации криопротекторов в растворах ДМАЦ/1,2-ПД и ДМАЦ/глицерин до 15% уровень сохранности образцов КТ повышался по сравнению с данными для 5%-х растворов. Результаты сохранности КТ для 15% ДМАЦ/ОЭГ n=5 достоверно ниже результатов замораживания КТ с 10%-й концентрацией веществ в криозащитных растворах, что, по-видимому, является следствием токсического действия более высоких концентраций криопротекторов как на этапе экспозиции, так и в процессе замо-

Таблица 2. РГШ тромбоцитов после экспозиции с растворами, содержащими комбинации криопротекторов, M±σ, n=5

Table 2. Platelet HSR after exposure with solutions, containing cryoprotectant combinations, M±σ, n=5.

Состав криозащитного раствора Composition of cryoprotective solution	Суммарная концентрация КП, % Total concentration of CPA, %	РГШ, % HSR, %		
		Время экспозиции, мин Exposition term, min		
		15	30	60
ДМСО DMSO	5	94±7	93±6	85±3*
	10	89±5*	87±5*	75±6*
	15	81±4*	81±6*	74±4*
ДМАЦ/1,2-ПД DMAC/1,2-PD	5	93±11	95±7	92±3#
	10	91±6*	93±7	85±8*
	15	86±10	86±9	79±4*
ДМАЦ/глицерин DMAC/glycerol	5	92±5	91±8	85±4*
	10	92±8	90±11	85±5*.*
	15	83±6*	83±8	79±4*
ДМАЦ/ОЭГ n=5 DMAC/OEG n=5	5	92±3	93±8	88±5*
	10	88±6*	90±8	80±9*
	15	82±5*	80±6*	75±6*
1,2-ПД/глицерин 1,2-PD/glycerol	5	92±6	95±7	88±8
	10	93±6	94±9	87±7*.*
	15	87±3*	86±6*	79±6*
1,2-ПД/ОЭГ n=5 1,2-PD/OEG n=5	5	86±4*	89±3*	86±10*
	10	83±6*	84±6*	81±4*
	15	83±4*	80±3*	78±2*

Примечания: * – отличия статистически достоверны по сравнению с соответствующим показателем для свежесыведенных КТ, p<0,05; # – отличия статистически достоверны по сравнению с соответствующим показателем для ДМСО, p<0,05.

Notes: * – differences are statistically significant compared to the corresponding index for fresh PCs, p<0.05; # – differences are statistically significant compared to the corresponding index for DMSO, p<0.05.

centration of substances in cryoprotective solutions, being apparently the result of a toxic effect of higher concentrations of cryoprotectants at both exposure and freeze-thawing stages. The highest level of cryoprotective effect was established for the solutions, containing amide/polyol combination.

The data, presented in Fig. 4, testify to the importance for the PCs cryopreservation results of such a factor as the duration of platelet exposure with cryoprotective medium before freezing. The experiments were

раживания-отогрева. Наиболее высокий уровень криозащитного действия установлен для растворов, содержащих сочетание амид/полиол.

Данные, представленные на рис.4, свидетельствуют о важном значении для результатов криоконсервирования КТ такого фактора, как длительность экспозиции тромбоцитов с криозащитной средой перед замораживанием. Исследования были проведены с 10%-ми растворами, содержащими комбинации ДМАЦ/1,2-ПД, ДМАЦ/глицерина и ДМАЦ/ОЭГ n=5 (соотношение криопротекторов

performed with 10% solutions, comprising combinations of DMAC/1,2-PD, DMAC/glycerol and DMAC/OEG n=5 (1:1 cryoprotectant ratio); 15, 30 and 60 min exposure time. Platelet number in PCs samples after freezing did not statistically and significantly differ, but the integrity of ADP-induced aggregation and HSR indices was statistically and significantly higher for PCs samples, frozen after 30 min exposure with cryoprotective solutions. Apparently, the processes, occurring within a positive 60 min exposure (Table 1 and 2) are manifested in a significant loss of platelet functional

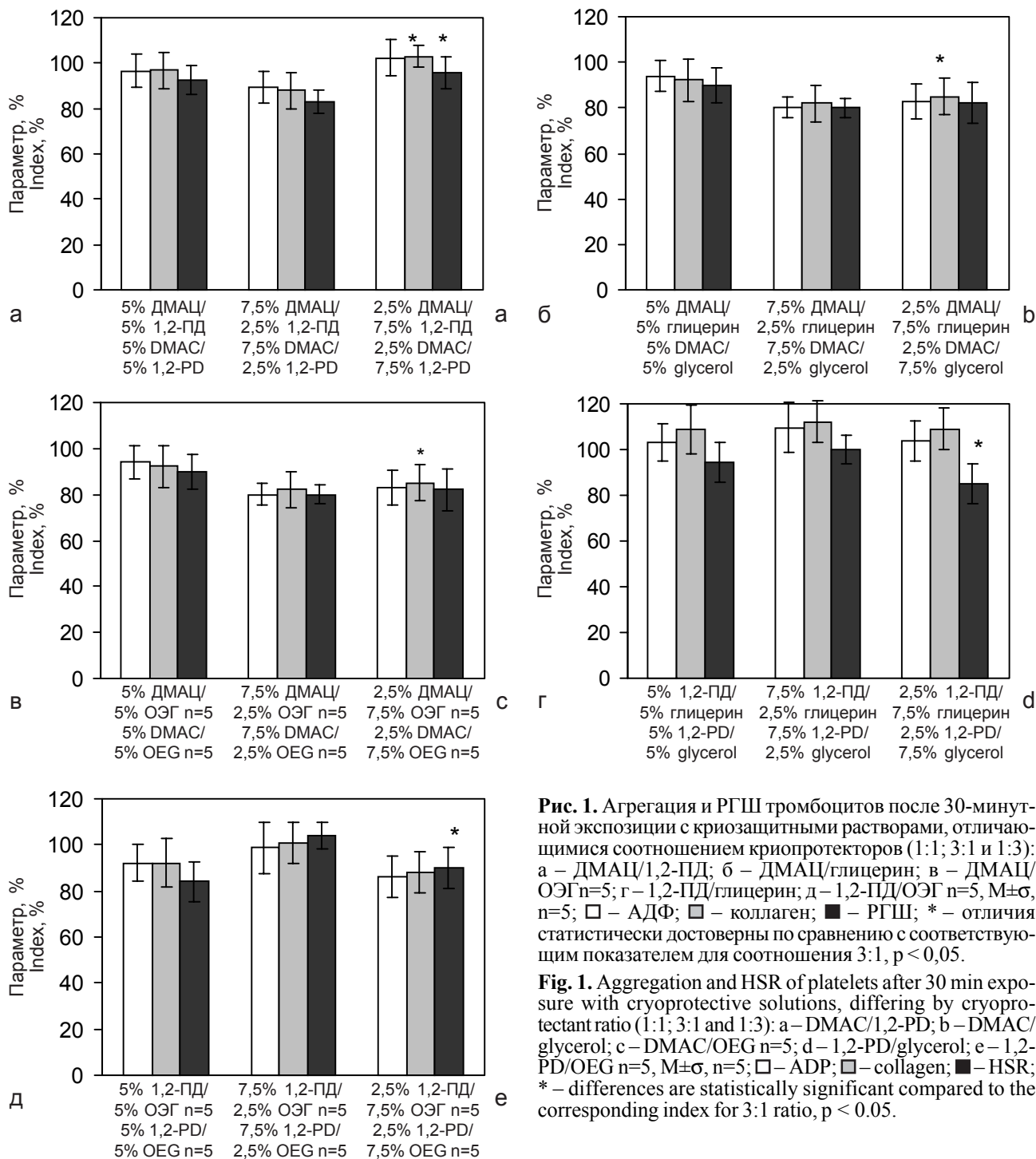


Рис. 1. Агрегация и РГШ тромбоцитов после 30-минутной экспозиции с криозащитными растворами, отличающимися соотношением криопротекторов (1:1; 3:1 и 1:3): а – ДМАЦ/1,2-ПД; б – ДМАЦ/глицерин; в – ДМАЦ/ОЭГ n=5; г – 1,2-ПД/глицерин; д – 1,2-ПД/ОЭГ n=5, М±σ, n=5; □ – АДФ; ▒ – коллаген; ■ – РГШ; * – отличия статистически достоверны по сравнению с соответствующим показателем для соотношения 3:1, p < 0,05.

Fig. 1. Aggregation and HSR of platelets after 30 min exposure with cryoprotective solutions, differing by cryoprotectant ratio (1:1; 3:1 and 1:3): a – DMAC/1,2-PD; b – DMAC/glycerol; c – DMAC/OEG n=5; d – 1,2-PD/glycerol; e – 1,2-PD/OEG n=5, M±σ, n=5; □ – ADP; ▒ – collagen; ■ – HSR; * – differences are statistically significant compared to the corresponding index for 3:1 ratio, p < 0.05.

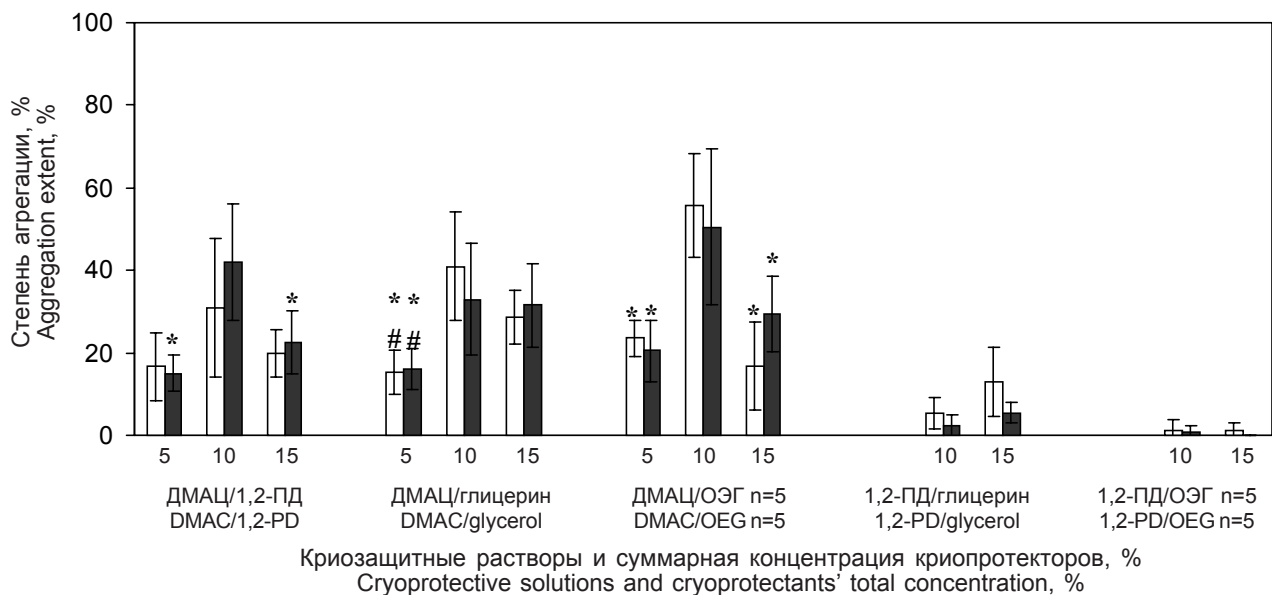


Рис. 2. Агрегация тромбоцитов после замораживания с криозащитными растворами, содержащими комбинации криопротекторов в суммарной концентрации 5, 10 и 15%, $M \pm \sigma$, $n=5$: □ – АДФ (200 мкМ); ■ – коллаген (20 мг/мл); * – отличия статистически достоверны по сравнению с соответствующими показателями для 10%-го комбинированного раствора, $p < 0,05$; # – отличия статистически достоверны по сравнению с соответствующими показателями для 15%-го комбинированного раствора, $p < 0,05$.

Fig. 2. Platelet aggregation after freezing with cryoprotective solutions, containing cryoprotectant combinations in total concentration of 5, 10 and 15%, $M \pm \sigma$, $n=5$; □ – ADP (200 μ M); ■ – collagen (20 mg/ml); * – differences are statistically significant compared to corresponding indices for 10% combined solution, $p < 0.05$; # – differences are statistically significant compared to corresponding indices for 15% combined solution, $p < 0.05$.

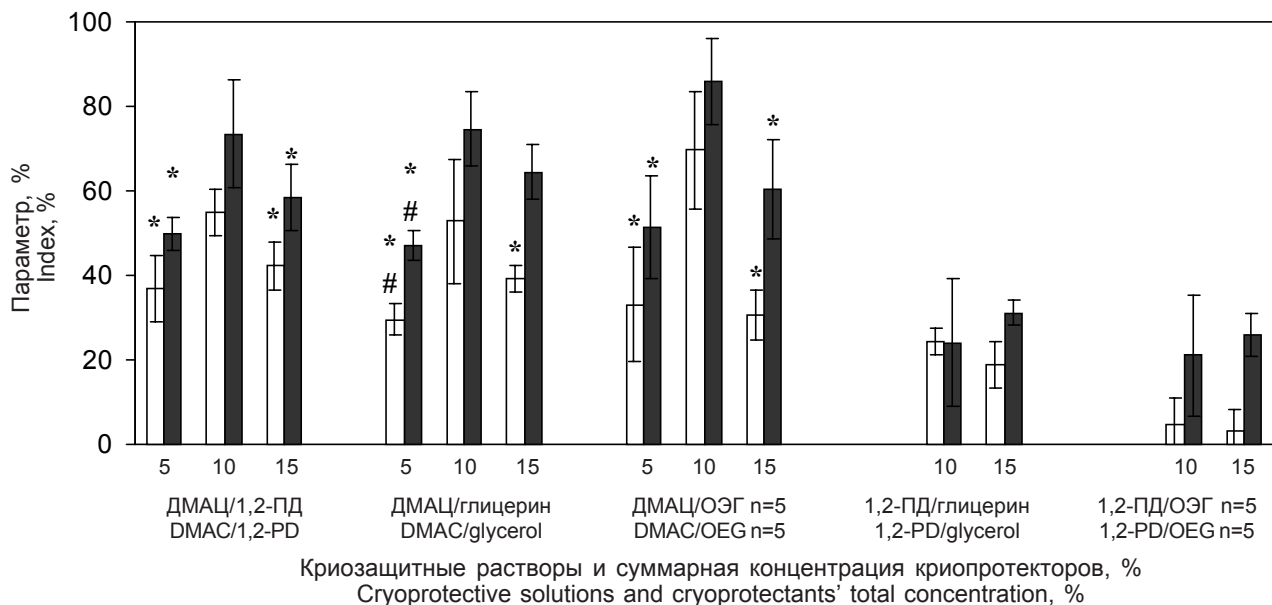


Рис. 3. РГШ и ретракция тромбоцитов после замораживания с криозащитными растворами, содержащими комбинации криопротекторов, $M \pm \sigma$, $n=5$: □ – РГШ; ■ – ретракция; * – отличия статистически достоверны по сравнению с соответствующими показателями для 10%-й суммарной концентрации криопротекторов, $p < 0,05$; # – отличия статистически достоверны по сравнению с соответствующими показателями для 15%-й суммарной концентрации криопротекторов, $p < 0,05$.

Fig. 3. Platelet HSR and clot retraction after freezing with cryoprotective solutions, containing cryoprotectant combinations, $M \pm \sigma$, $n=5$; □ – HSR; ■ – clot retraction; * – differences are statistically significant compared to corresponding indices for 10% total concentration of cryoprotectants, $p < 0.05$; # – differences are statistically significant compared to corresponding indices for 15% total concentration of cryoprotectants, $p < 0.05$.

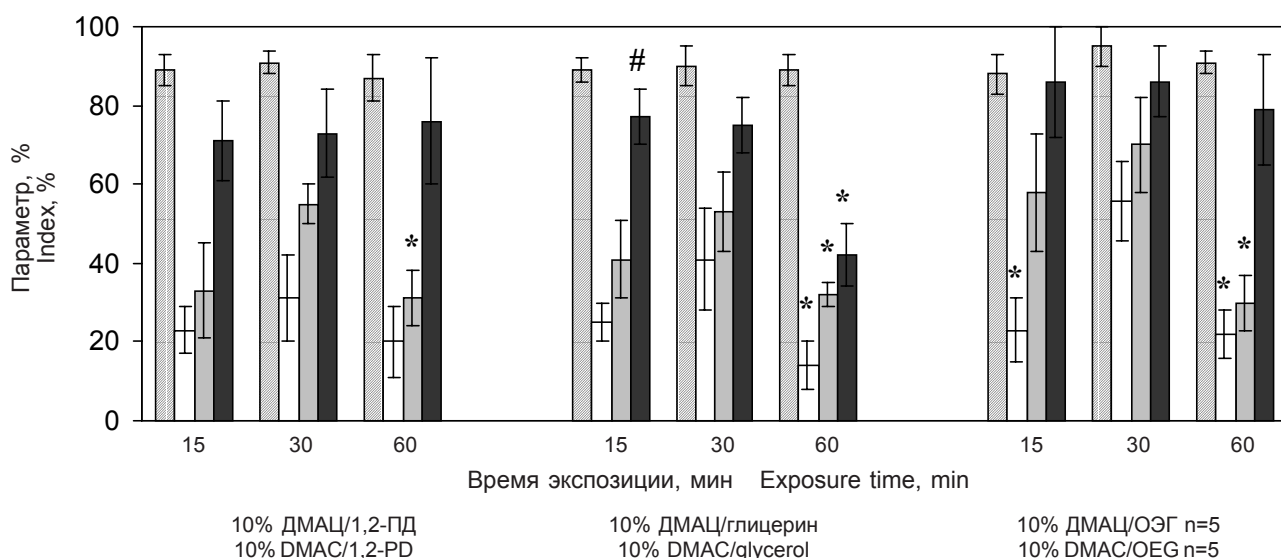


Рис. 4. Сохранность КТ после замораживания с криозащитными растворами в зависимости от времени экспозиции, $M \pm \sigma$, $n=5$: \square – количество; \square – АДФ (200 мкМ); \square – РГШ; \blacksquare – ретракция; * – отличия статистически достоверны по сравнению с соответствующими показателями для 30 мин, $p < 0,05$; # – отличия статистически достоверны по сравнению с соответствующими показателями для 60 мин, $p < 0,05$.

Fig. 4. PCs integrity after freezing with cryoprotective solutions depending on exposure time, $M \pm \sigma$, $n=5$: \square – quantity; \square – ADP (200 μM); \square – HSR; \blacksquare – clot retraction; * – differences are statistically significant compared to the corresponding indices for 30 min, $p < 0.05$; # – differences are statistically significant compared to corresponding indices for 60 min, $p < 0.05$.

1:1); время экспозиции – 15, 30 и 60 мин. Количество тромбоцитов в образцах КТ после замораживания достоверно не отличалось, однако сохранность показателей АДФ-индуцированной агрегации и РГШ была достоверно выше для образцов КТ, замороженных после 30-минутной экспозиции с криозащитными растворами. По-видимому, процессы, которые происходят в течение продолжительной – 60-минутной экспозиции (табл. 1 и 2), проявляются в значительной потере функциональной активности тромбоцитов на этапе замораживания-отогрева (рис. 4). Более низкий уровень сохранности КТ, замороженных после 15-минутной экспозиции, позволяет предположить, что тромбоцитам необходим временной интервал, в течение которого происходит процесс их “адаптации” к изменениям среды. Отсутствием интервала “адаптации” объясняются, по-видимому, низкие показатели сохранности КТ после криоконсервирования с комбинацией ДМАЦ/1,2-ПД: тромбоциты замораживали сразу после соединения с криоконсервантом [4].

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что 30 минут – оптимальный временной интервал от момента соединения

activity at freeze-thawing stage (Fig. 4). Lower level of PCs integrity, frozen after 15 min exposure, enables suggesting about a necessary time interval for platelets, during which the process of their “adaptation” to medium changes occurs. The absence of “adaptation” interval apparently explains low indices of PCs integrity after cryopreservation with DMAC/1,2-PD combination: platelets were frozen right after combining with cryopreservative [4].

Thus, the results of performed experiments testify to a 30 min time interval as an optimal one from the

Таблица 3. Количество тромбоцитов (в процентах по отношению к показателю для свежeweделенных КТ) после замораживания с криозащитными растворами, содержащими комбинации криопротекторов, $M \pm \sigma$, $n=5$

Table 3. Platelet number (percentage in respect of the index for fresh PCs) after freezing with cryoprotective solutions, containing cryoprotectant combinations, $M \pm \sigma$, $n=5$

Суммарная концентрация криопротекторов, % Total concentration of cryoprotectants, %	Состав криозащитного раствора Composition of cryoprotective solution				
	ДМАЦ/1,2-ПД DMAC/1,2-PD	ДМАЦ/глицерин DMAC/glycerol	ДМАЦ/ОЭГ $n=5$ DMAC/OEG $n=5$	1,2-ПД/глицерин 1,2-PD/glycerol	1,2-ПД/ОЭГ $n=5$ 1,2-PD/OEG $n=5$
5	92±3	86,3±2,1	93,3±3,8	–	–
10	87,5±3,1	90,0±5,0	95,0±5,0	76,7±4,2	60,0±9,2
15	91,3±4,2	90,7±4,9	88,0±7,0	86,0±3,5	57,0±3,6

КТ с комбинированными криозащитными растворами до начала их замораживания.

На рис. 5 представлены результаты сравнительного изучения сохранности КТ после замораживания с криозащитными растворами, содержащими 10%-ю концентрацию в плазме одного из криопротекторов (ДМАЦ, 1,2-ПД, глицерин, ОЭГ n=5) или 10%-ю суммарную концентрацию их различных комбинаций. Замораживание тромбоцитов с 10% ДМСО в наших исследованиях служит дополнительным контролем (“золотой стандарт” криоконсервирования КТ). После замораживания КТ с монокриопротекторами (рис. 5, а) уровень сохранности таких параметров, как РГШ и ретракция был ненамного, хотя и достоверно выше для

moment of PCs binding with combined cryoprotective solutions to their freezing beginning.

Fig. 5 shows the results of a comparative study of PC integrity after freezing with cryoprotective solutions, containing 10% concentration in plasma of one of cryoprotectants (DMAC, 1,2-PD, glycerol, OEG n=5) or 10% total concentration of their different combinations. Platelet freezing with 10% DMSO serves in our researches as an additional control (“gold standard” for PCs cryopreservation). After PC freezing with monocryoprotectants (Fig. 5a) the integrity level of such parameters, as HSR and retraction was slightly, but statistically higher for DMSO, compared to DMAC, 1,2-PD, glycerol or OEG n=5 ($p < 0.05$); by the indices of ADP-induced aggregation no statistically significant

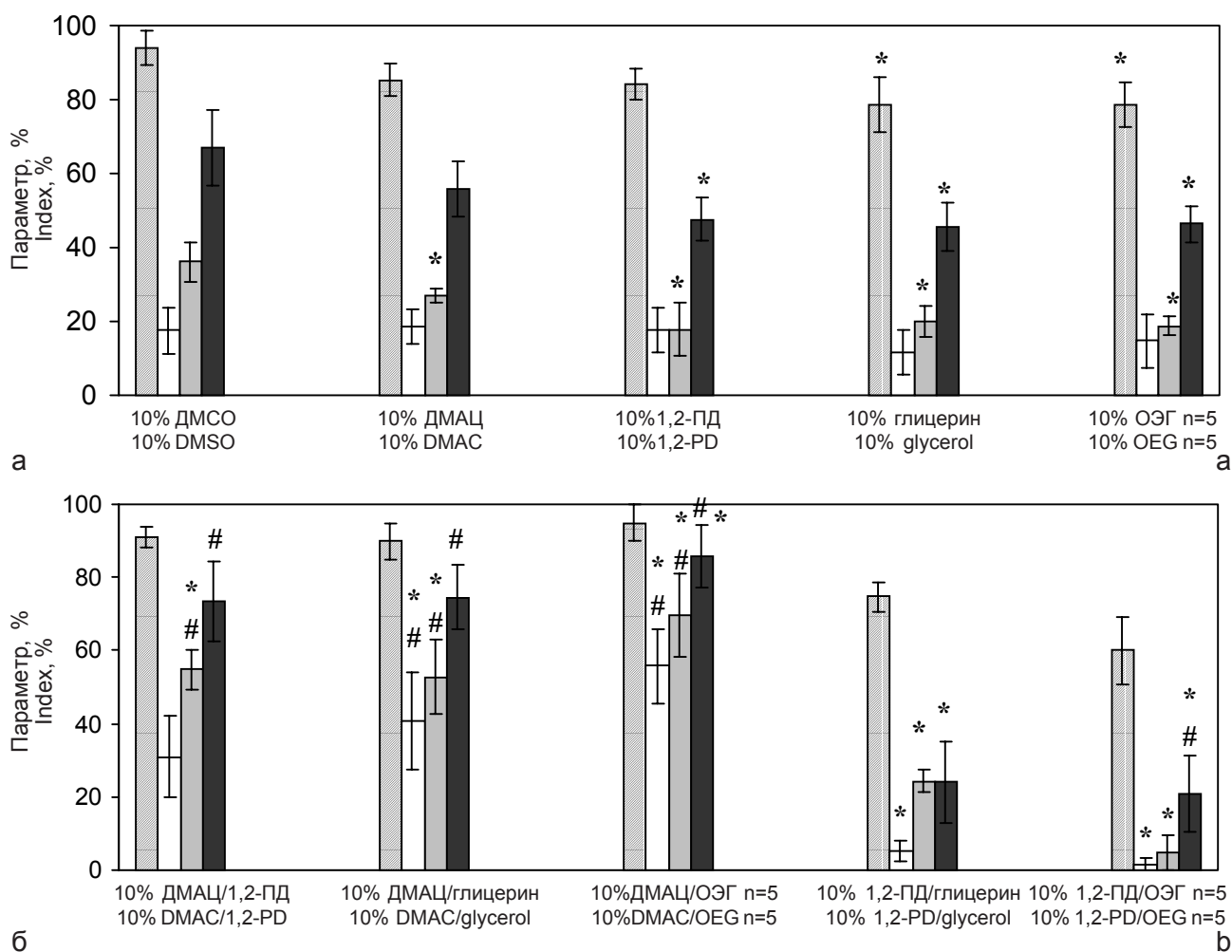


Рис. 5. Показатели сохранности КТ после замораживания с криозащитными растворами на основе монокриопротекторов (а) и комбинаций криопротекторов (б), $M \pm \sigma$, $n=5$: ▨ – количество; □ – АДФ (200 мкМ); ■ – РГШ; ■ – ретракция; * – отличия статистически достоверны по сравнению с соответствующими показателями для ДМСО, $p < 0,05$; # – отличия статистически достоверны по сравнению с соответствующими показателями для криопротекторов, которые входят в состав комбинированных криоконсервантов, $p < 0,05$.

Fig. 5. Indices for PCs integrity after freezing with cryoprotective solutions, based on monocryoprotectants (a) and cryoprotectant combinations (b), $M \pm \sigma$, $n=5$; ▨ – quantity; □ – ADP (200 μ M); ■ – HSR; ■ – clot retraction; * – differences are statistically significant compared to the corresponding indices for DMSO, $p < 0.05$; # – differences are statistically significant compared to the corresponding indices for cryoprotectants, being a part of combined cryopreservatives, $p < 0.05$;

ДМСО по сравнению с ДМАЦ, 1,2-ПД, глицерином или ОЭГ $n=5$ ($p < 0,05$); по показателям АДФ-индуцируемой агрегации достоверных отличий не установлено. Вместе с тем данных о существенном преимуществе ДМСО по сравнению с другими криопротекторами не получено: отличия между величинами не превышали 7–15%. Кроме того, следует подчеркнуть, что для криопротекторов ДМАЦ, 1,2-ПД и ОЭГ $n=5$ более высокие результаты сохранности КТ установлены для 5–6%-х концентраций этих веществ в криозащитных растворах [3, 5, 8].

Применение комбинаций криопротекторов в криозащитных растворах (5%-я концентрация каждого криопротектора, суммарная – 10%-я) позволило существенно повысить уровень сохранности КТ после замораживания по сравнению с монокриопротекторами (рис. 5, б). Этот вывод справедлив только по отношению к комбинациям ДМАЦ с 1,2-ПД, глицерином или ОЭГ $n=5$. После замораживания образцов КТ с криозащитными растворами, содержащими 10%-е концентрации ДМАЦ/1,2-ПД, ДМАЦ/глицерин и ДМАЦ/ОЭГ $n=5$, отмечено значительное достоверное повышение показателей сохранности АДФ-агрегации, РГШ и ретракции как при сравнении с ДМСО, так и с монокриопротекторами, составляющими комбинацию в криоконсерванте (рис. 5, б). Наиболее высокие результаты получены при использовании сочетания проникающего ДМАЦ и непроникающего ОЭГ $n=5$: в результате замораживания в образцах КТ сохранялось в среднем $95 \pm 5\%$ тромбоцитов, степень АДФ-агрегации составляла $55,7 \pm 10,4\%$, РГШ – $69,7 \pm 11,5\%$, ретракции – $85,7 \pm 10,2\%$. Для тромбоцитов, замороженных с комбинацией ДМАЦ/ОЭГ $n=5$, отмечены не только высокие показатели абсолютной величины РГШ, но и начальная скорость “обратного хода” реакции, а также скорости агрегации.

Для комбинаций полиолов в ограждающих растворах (1,2-ПД/глицерин и 1,2-ПД/ОЭГ $n=5$) получены неудовлетворительные результаты, особенно для сочетания 1,2-ПД/ОЭГ $n=5$ (рис. 5, б).

Выводы

Результаты проведенных исследований показали преимущества замораживания тромбоцитов с ограждающими растворами, содержащими комбинации криопротекторов. Сравнительный анализ эффективности ограждающих растворов свидетельствует о высоком уровне криозащитного действия сочетания криопротекторов ДМАЦ/ОЭГ $n=5$, ДМАЦ/1,2-ПД и ДМАЦ/глицерин. Использование в ограждающих растворах 5%-й концентра-

дifferences were revealed. However no data about a significant advantage of DMSO, compared to other cryoprotectants were obtained: differences between values did not exceed 7–15%. In addition, of note is the fact, that for DMAC, 1,2-PD and OEG $n=5$ the higher results of PCs integrity were established for 5–6% concentrations of these substances in cryoprotective solutions [3, 5, 8].

The application of cryoprotective combinations in cryoprotective solutions (5 and 10% concentrations of each cryoprotectant and a total one, correspondingly) allowed a considerable augmentation of PCs integrity level after freezing, compared to monocryoprotectants (Fig. 5b). This conclusion is true only in respect of the combinations of DMAC with 1,2-PD, glycerol or OEG $n=5$. After PCs samples' freezing with cryoprotective media, comprising 10% concentrated DMAC/1,2-PD, DMAC/glycerol and DMAC/OEG $n=5$, there was noted a considerable statistically significant augmentation of integrity indices of ADP-aggregation, HSR and clot retraction both when comparing with DMSO and with monocryoprotectants, making the composition in a cryopreservative solution (Fig. 5b). The best results were obtained when using the combination of penetrative DMAC and non-penetrative OEG $n=5$: as a result of freezing in PCs samples there were preserved $95 \pm 5\%$ platelets in average, the degree of ADP-aggregation, HSR and clot retraction made 55.7 ± 10.4 , 69.7 ± 11.5 , $85.7 \pm 10.2\%$, correspondingly. For platelets, frozen with DMAC/OEG $n=5$ combination there were noted not only high indices of HSR absolute value, but an initial rate of reaction “reversal”, as well as aggregation rate.

For polyol combinations in cryoprotective solutions (1,2-PD/glycerol and 1,2-PD/OEG $n=5$) there were obtained negative results, especially for 1,2-PD/OEG $n=5$ combination (Fig. 5b).

Conclusions

The results of the researches performed showed the advantages of platelet freezing with cryopreservative solutions, containing cryoprotectant combinations. A comparative analysis of the efficiency of cryoprotective solutions testifies to a high level of cryoprotective effect of combining cryoprotectants DMAC/OEG $n=5$, DMAC/1,2-PD and DMAC/glycerol. Using 5% concentration of each cryoprotectants in cryoprotective solutions (10% total concentration) enabled to significantly increase the level of PCs integrity after freezing, compared to the results of platelet cryopreservation with monocryoprotectants. The highest level of PCs integrity was achieved when using combinations of penetrative DMAC and non-penetrative OEG $n=5$ in cryopreservative.

ции каждого криопротектора (10%-я суммарная концентрация) позволило значительно повысить уровень сохранности КТ после замораживания по сравнению с результатами криоконсервирования тромбоцитов с монокриопротекторами. Наиболее высокий уровень сохранности КТ получен при использовании комбинации проникающего ДМАЦ и непроникающего ОЭГ n=5 в криоконсерванте.

Литература

1. Аграненко В.А., Файнштейн Ф.Э., Голубева В.Л. и др. Криоконсервированные тромбоциты и их клиническая эффективность // Пробл. гематологии и переливания крови.– 1987.– Т. 32, №5.– С. 8–12.
2. Азовская С.А., Волкова Р.И., Соколов В.Ф. Криоконсервирование тромбоцитов и их функциональная полноценность // Гематология и трансфузиология.– 1995.– Т. 40, №5.– С. 44–46.
3. Компаниец А.М. Консервирование концентратов тромбоцитов и их лечебная эффективность: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.– М., 1992.– 52 с.
4. Компанієць А.М., Книш О.В., Гуріна Т.М. та інш. Дослідження морфофункціональної збереженості тромбоцитів на етапах криоконсервування // Пробл. криобиологии.– 2006.– Т. 16, №2.– С. 182–191.
5. Компанієць А.М., Николенко А.В., Луговой В.И. Криоконсервирование тромбоцитов с веществами ряда полиолов // Труды Междунар. конф. по криобиологии. – Харьков, 1992. – С. 86.
6. Лебедева Е.А., Ефимова С.Ю. Клиническая эффективность концентрата тромбоцитов у гематологических больных // Пробл. гематологии и переливания крови.– 2000.– №2.– С. 27–28.
7. Николенко А.В., Компанієць А.М., Луговой В.И. Криопротекторные свойства полиолов и их производных при замораживании тромбоцитов // Пробл. криобиологии.– 1995.– №4.– С. 36–40.
8. Николенко А.В. Криопротекторные свойства полиолов и их производных при замораживании тромбоцитов: Дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1991. – 129 с.
9. Порешина Л.П., Компанієць А.М., Куткина М.В. и др. Аллоиммунизация HLA и рефрактерность к трансфузиям тромбоцитов у гематологических больных // Иммунология.– 1993.– №4.– С. 79–84.
10. Ронин В.С. Способ окраски тромбоцитов для подсчета в счетной камере // Лаб. дело.– 1983.– №1.– С. 61–62.
11. Степанова И.П., Белов Е.В., Селиванов Е.А. и др. Состояние и актуальные задачи службы крови в России // Материалы научно-практ. конф. “Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии”. – СПб, 2000. – С. 4–7.
12. Пат. № 15014 Україна, МПК8 А0N 1/02. Спосіб видалення криопротектора із суспензії тромбоцитів / В.І. Грищенко, А.М. Компанієць, О.В. Заявлено 18.11.05; Опубл. 15.06.06, Бюл. №6.
13. Аграненко В.А., Компанієць А.М. Factors influencing on the efficacy of platelet transfusion therapy // Proceedings of XXIII Congress of ISBT.– Amsterdam, 1994.– P. 94.
14. Arnaud F.G., Pegg D.E. Cryopreservation of human platelets with 1.4 M glycerol at –75 degrees C in PVC blood packs // Thromb. Res.– 1990.– Vol. 57, N6.– P. 919–924.
15. Arnaud F. Frozen/thawed platelets: importance of osmotic tolerance and platelet subpopulations // Cryobiology. – 1999.– Vol. 38, N3.– P. 192–199.
16. Arnaud F.G., Pegg D.E. Cryopreservation of human platelets with propane-1,2-diol // Cryobiology. – 1990. – Vol. 27, N2.– P. 130–136.

References

1. Аграненко В.А., Файнштейн Ф.Э., Голубева В.Л. et al. Cryopreserved platelets and their clinical efficiency // Problemy Gematologii i Perelivaniya Krovi.– 1987.– Vol. 32, N5.– P. 8–12.
2. Azovskaya S.A., Volkova R.I., Sokol'tsov V.F. Platelet cryopreservation and their functional integrity // Gematol. Transfuziol.– 1995.– Vol. 40, N5.– P. 44–46.
3. Kompaniets A.M. Preservation of platelet concentrates and their therapeutic efficiency: Author's abstract of thesis of doctor of medical sciences.– Moscow, 1992.– 52 p.
4. Kompaniets A.M., Knysh O.V., Gurina T.M. et al. Study of morphofunctional integrity of platelets at cryopreservation stages // Problems of Cryobiology.– 2006.– Vol. 16, N2.– P. 182–191.
5. Kompaniets A.M., Nikolenko A.V., Lugovoy V.I. Platelet cryopreservation with substances of polyol series // Proc. of Intern. Conference on Cryobiology.– Kharkov, 1992.– P. 86.
6. Lebedeva E.A., Efimova S.Yu. Clinical efficiency of platelet concentrate in haematological patients // Problemy Gematologii i Perelivaniya Krovi.– 2000.– N2.– P. 27–28.
7. Nikolenko A.V., Kompaniets A.M., Lugovoy V.I. Cryoprotective properties of polyols and their derivatives during freezing of platelets // Problems of Cryobiology.– 1995.– N4.– P. 36–40.
8. Nikolenko A.V. Cryoprotective properties of polyols and their derivatives during platelet freezing: Thesis of candidate of biol. sciences.– Kharkov, 1991.– 129 p.
9. Poreshina L.P., Kompaniets A.M., Kutjina M.V. et al. HLA alloimmunisation and refractoriness to platelet transfusions in haematological patients // Immunologiya.– 1993.– N4.– P. 79–84.
10. Ronin V.S. Way for platelet staining to calculate in counting chamber // Lab. Delo.– 1983.– N1.– P. 61–62.
11. Stepanova I.P., Belov E.V., Selivanov E.A. et al. State and actual tasks of blood service in Russia // Proc. of scientific and practical conference “Actual Questions of Haematology and Transfusiology”.– St.-Petersburg, 2000.– P. 4–7.
12. Patent N 15014 Ukraine IPC⁸ A0N 1/02. Way of cryoprotectant removal from platelet suspension / V.I. Grischenko, A.M. Kompaniets, O.V. Knysh.– Applied 18.11.05, Published 15.06.06.– Bull. N6.
13. Аграненко В.А., Компанієць А.М. Factors influencing on the efficacy of platelet transfusion therapy // Proceedings of XXIII Congress of ISBT.– Amsterdam, 1994.– P. 94.
14. Arnaud F.G., Pegg D.E. Cryopreservation of human platelets with 1.4 M glycerol at –75 degrees C in PVC blood packs // Thromb. Res.– 1990.– Vol. 57, N6.– P. 919–924.
15. Arnaud F. Frozen/thawed platelets: importance of osmotic tolerance and platelet subpopulations // Cryobiology. – 1999.– Vol. 38, N3.– P. 192–199.
16. Arnaud F.G., Pegg D.E. Cryopreservation of human platelets with propane-1,2-diol // Cryobiology. – 1990. – Vol. 27, N2.– P. 130–136.
17. Balint B., Paunovic D., Vucetic D. et al. Controlled-rate versus uncontrolled-rate freezing as predictors for platelet cryopreservation efficacy // Transfusion.– 2006.– Vol. 46, N2.– P. 230–235.
18. Born G.V.R., Cross M.J. The aggregation of blood platelets // J. Physiol. (London).– 1963.– Vol. 168, N1.– P. 178–195.
19. British Committee for Standards in Haematology, Blood Transfusion Task Force: Guidelines for the use of platelet transfusions // Br. J. Haematol.– 2003.– Vol. 122, N2.– P. 10–23.
20. Cardigan R., Turner C., Harrison P. Current methods of assessing platelet function: relevance to transfusion medicine // Vox Sang.– 2005.– Vol. 88, N3.– P. 153–163.
21. Dijkstra-Tiekstra M.J., de Korte D., Pietersz R.N. et al. Comparison of various dimethylsulphoxide-containing solutions for cryopreservation of leucoreduced platelet concentrates // Vox Sang.– 2003.– Vol. 85, N4.– P. 276–282.

17. Balint B., Paunovic D., Vucetic D. et al. Controlled-rate versus uncontrolled-rate freezing as predictors for platelet cryopreservation efficacy // *Transfusion.*– 2006.– Vol. 46, N2.– P. 230–235.
18. Born G.V.R., Cross M.J. The aggregation of blood platelets // *J. Physiol. (London).*– 1963.– Vol. 168, N1.– P. 178–195.
19. British Committee for Standards in Haematology, Blood Transfusion Task Force: Guidelines for the use of platelet transfusions // *Br. J. Haematol.*– 2003.– Vol. 122, N2.– P. 10–23.
20. Cardigan R., Turner C., Harrison P. Current methods of assessing platelet function: relevance to transfusion medicine // *Vox Sang.*– 2005.– Vol. 88, N3.– P. 153–163.
21. Dijkstra-Tiekstra M.J., de Korte D., Pietersz R.N. et al. Comparison of various dimethylsulphoxide-containing solutions for cryopreservation of leucoreduced platelet concentrates // *Vox Sang.*– 2003.– Vol. 85, N4.– P. 276–282.
22. Gao D.Y., Neff K., Xiao H.Y. et al. Development of optimal techniques for cryopreservation of human platelets. I. Platelet activation during cold storage (at 22 and 8 degrees C) and cryopreservation // *Cryobiology.*– 1999.– Vol. 38, N3.– P. 225–35.
23. Han T. Stutzman L., Cohen E., Kim U. Effect of platelet transfusion on hemorrhage in patients with acute leukemia // *Cancer.*– 1966.– Vol. 19, N3.– P. 19–37.
24. Levin R.H. Handbook for platelet transfusion therapy.– Bethesda.: National Cancer Institute, 1964.– 31 p.
25. McCulloch J., Vesicle D.V., Benjamin P.J. et al. Therapeutic efficacy and safety of platelet treated with a photochemical process for pathogen inactivation the Sprint Trial // *Blood.* – 2004.– Vol. 104, N5.– P. 1534–1542.
26. Pedrazzoli P., Perotti C., Noris P. et al. Autologous platelet transfusion in patients receiving high-dose chemotherapy and circulating progenitor cell transplantation for stage II/III breast cancer // *Haematologica.*– 1998.– Vol. 83, N8.– P. 718–723.
27. Slichter S.J. Mechanisms and management of platelet refractoriness // In: *Transfusion Medicine in the 1990s* / Ed. by Nance S.J.– Arlington, 1990.– P. 95–178.
28. Slichter S.J. Platelet transfusion: future directions // *Vox Sang.*– 2004.– Vol. 8, Suppl. 2.– P. S47–S51.
29. Sullivan M.T., Cotten R., Read E.J., Wallace E.L. Blood collection and transfusion in the United States in 2001 // *Transfusion.*– 2007.– Vol. 47, N3.– P. 366–368.
30. Surgenor D.M., Schnitzer S.S. The nation's blood resource: A summary report. NIH Publication #85-2028.– Rockville, MD: National Institutes of Health, 1985.
31. Taylor M.A. Cryopreservation of platelets: an *in vitro* comparison of four methods // *J.Clin. Pathol.*– 1981.– Vol. 34, N1.– P. 71–75.
32. Valeri C.R., Rango G., Khuri S. Freezing human platelets with 6 percent dymethyl sulfoxide with removal of the supernatant solution before freezing and sstorage at –80°C without postthaw processing // *Transfusion.*– 2005.– Vol. 45, N12.– P. 1890–1898.
33. Van Imhoff G., Arnaud F., Postmus P. et al. Autologous cryopreserved platelets and prophylaxis of bleeding in autologous bone marrow transplantation // *Blut.*– 1983.– Vol. 47, N2.– P. 203–209.
34. Yokomuro M., Ebine K., Shiroma K. et al. Safety and efficacy of autologous platelet transfusion in cardiac surgery: comparison of cryopreservation, blood collection on the day before surgery and blood collection during surgery // *Cryobiology.*– 1999.– Vol. 38, N3.– P. 236–242.
22. Gao D.Y., Neff K., Xiao H.Y. et al. Development of optimal techniques for cryopreservation of human platelets. I. Platelet activation during cold storage (at 22 and 8 degrees C) and cryopreservation // *Cryobiology.*– 1999.– Vol. 38, N3.– P. 225–35.
23. Han T. Stutzman L., Cohen E., Kim U. Effect of platelet transfusion on hemorrhage in patients with acute leukemia // *Cancer.*– 1966.– Vol. 19, N3.– P. 19–37.
24. Levin R.H. Handbook for platelet transfusion therapy.– Bethesda.: National Cancer Institute, 1964.– 31 p.
25. McCulloch J., Vesicle D.V., Benjamin P.J. et al. Therapeutic efficacy and safety of platelet treated with a photochemical process for pathogen inactivation the Sprint Trial // *Blood.* – 2004.– Vol. 104, N5.– P. 1534–1542.
26. Pedrazzoli P., Perotti C., Noris P. et al. Autologous platelet transfusion in patients receiving high-dose chemotherapy and circulating progenitor cell transplantation for stage II/III breast cancer // *Haematologica.*– 1998.– Vol. 83, N8.– P. 718–723.
27. Slichter S.J. Mechanisms and management of platelet refractoriness // In: *Transfusion Medicine in the 1990s* / Ed. by Nance S.J.– Arlington, 1990.– P. 95–178.
28. Slichter S.J. Platelet transfusion: future directions // *Vox Sang.*– 2004.– Vol. 8, Suppl. 2.– P. S47–S51.
29. Sullivan M.T., Cotten R., Read E.J., Wallace E.L. Blood collection and transfusion in the United States in 2001 // *Transfusion.*– 2007.– Vol. 47, N3.– P. 366–368.
30. Surgenor D.M., Schnitzer S.S. The nation's blood resource: A summary report. NIH Publication #85-2028.– Rockville, MD: National Institutes of Health, 1985.
31. Taylor M.A. Cryopreservation of platelets: an *in vitro* comparison of four methods // *J.Clin. Pathol.*– 1981.– Vol. 34, N1.– P. 71–75.
32. Valeri C.R., Rango G., Khuri S. Freezing human platelets with 6 percent dymethyl sulfoxide with removal of the supernatant solution before freezing and sstorage at –80°C without postthaw processing // *Transfusion.*– 2005.– Vol. 45, N12.– P. 1890–1898.
33. Van Imhoff G., Arnaud F., Postmus P. et al. Autologous cryopreserved platelets and prophylaxis of bleeding in autologous bone marrow transplantation // *Blut.*– 1983.– Vol. 47, N2.– P. 203–209.
34. Yokomuro M., Ebine K., Shiroma K. et al. Safety and efficacy of autologous platelet transfusion in cardiac surgery: comparison of cryopreservation, blood collection on the day before surgery and blood collection during surgery // *Cryobiology.*– 1999.– Vol. 38, N3.– P. 236–242.

Accepted in 20.10.2009

Поступила 20.10.2009