

Дослідження впливу швидкості охолодження в різних температурних інтервалах на ступінь пошкодження тромбоцитів

UDC 547.42:612.111.7

T.M. GURINA*, O.V. KNYSH, A.M. KOMPANIETS

Studying the Cooling Rate Effect Within Different Temperature Range on Platelet Damage Extent

Досліджено вплив швидкості охолодження в температурних інтервалах кристалізації кріобіологічної системи та низькотемпературного евтектичного розшарування розчину кріопротектора на ступінь пошкодження тромбоцитів крові людини, який визначали за активністю цитозольних ферментів в позаклітинному середовищі після кріоконсервування. Показано, що проходження зазначених температурних інтервалів з певною контрольованою швидкістю значно знижує ступінь пошкодження кров'яних пластинок.

Ключові слова: кріоконсервування, тромбоцити, швидкість охолодження.

Исследовано влияние скорости охлаждения в температурных интервалах кристаллизации кріобіологіческой системы и низькотемпературного евтектического расслоения раствора кріопротектора на степень повреждения тромбоцитов крови человека, которую определяли по активности цитозольных ферментов во внеклеточной среде после кріоконсервирования. Показано, что прохождение указанных температурных интервалов с определенной контролируемой скоростью значительно снижает степень повреждения кровяных пластинок.

Ключевые слова: кріоконсервирование, тромбоциты, скорость охлаждения.

There was investigated the cooling rate effect within temperature range of cryobiological system crystallisation and low temperature eutectic stratification of cryoprotectant solution on human blood platelet damage extent, determined by cytosol enzyme activity in extracellular medium after cryopreservation. Passing through the mentioned temperature range with the certain controlled rate was shown to significantly reduce the blood platelet damage extent.

Key-words: cryopreservation, platelets, cooling rate

На тлі суттєвого зменшення кількості донорів та підвищення кількості інфікованої крові адекватне забезпечення лікувальних закладів концентраціями тромбоцитів можливе лише за умови впровадження ефективного способу їх довгострокового зберігання – кріоконсервування. Збільшення проміжку часу між забором та трансфузією крові дозволяє проводити додаткове обстеження запасів крові на наявність збудників інфекційних захворювань, що значно зменшує ризик передачі трансмісивних інфекцій. Протягом тривалого часу ведуться пошуки методу кріоконсервування тромбоцитів, який забезпечив би достатній рівень біологічної повноцінності цих клітин. Однією з найважливіших умов отримання максимального рівня збереженості кров'яних пластинок після відігрівання є оптимальний режим їх охолодження [8]. Розробка ефективного методу кріоконсервування можлива лише на основі надійної кріобіологічної теорії та ґрунтовного вивчення біохімії та фізіології тромбоцитів [14]. У зв'язку з цим виникає необхідність проведення досліджень, спрямованих на виявлення окремих факторів, які можуть спри-

At the background of a significant decrease in donor number and increase in infected blood amount an adequate supplying medical institutions with platelet concentrates is possible only if introduce an efficient way for their long-term storage: cryopreservation. Extended time interval between blood procurement and transfusion enables performing an additional examination of blood stocks for infectious disease agent presence, that considerably reduces the risk for infection transmission. The search for method of platelet cryopreservation with optimal cooling regimen, which could provide a sufficient level of these cells biological integrity has been made for a long time [8]. Elaboration of efficient cryopreservation method is only possible if basing on a reliable cryobiological theory and profound study of platelet biochemistry and physiology [14]. Due to this fact there is necessity in research, oriented to revealing some factors, capable to damage platelets under cryopreservation.

The research was targeted to investigate the influence of samples' cooling rate within temperature range of cryobiological system crystallisation and low temperature eutectic stratification of cryoprotectant

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, м. Харків

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

* Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015; тел.: +38 (057) 373-41-11, факс: +38 (057) 373-30-84, електронна пошта: cryo@online.kharkov.ua

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 4111, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

чиняти пошкодження тромбоцитів під час кріоконсервування.

Мета роботи – дослідження впливу швидкості охолодження зразків у температурних інтервалах кристалізації кріобіологічної системи та низькотемпературного евтектичного розшарування розчину кріопротектора на ступінь пошкодження тромбоцитів після кріоконсервування.

Матеріали і методи

Матеріалом для досліджень були концентрати тромбоцитів (КТ), які отримували фракціонуванням цільної донорської крові, заготовленої на консерванті “Глюгіцир” у полімерні контейнери „Гемакон” (ВАТ “Синтез”, Росія). Виділення КТ здійснювали за допомогою рефрижераторної центрифуги ЦРЛ 05-01 у перші чотири години після забору крові за методом [1]. Перед проведенням експериментальних досліджень КТ зберігали при температурі 20...24°C у контейнерах “Компoplast” (ВАТ “Синтез”, Росія) до 18-24 годин при постійному перемішуванні на автоматичній мішалці (ІПКіК НАНУ) зі швидкістю 2 об/хв. Кріоконсервування КТ проводили без кріопротектора та з використанням 1,4 М розчину ДМСО на плазмі, який готували *ex tempore* і додавали до КТ у співвідношенні 1:1. При заморожуванні без кріопротектора замість кріозахисного розчину у концентрат клітин вводили такий же об’єм аутологічної плазми. Кінцевий об’єм зразка становив 1,6 мл. Заморожування проводили одразу після введення кріозахисного розчину або аутологічної плазми в КТ за допомогою програмного заморожувача “Cryoson” (Німеччина) у кріоампулах “Nunc”. Для ресстрації програми заморожування в еталонному зразку використовували мідь-константову термопару та самописець “Endim 622.01” (Німеччина).

При дослідженні впливу швидкості охолодження в температурному інтервалі кристалізації кріобіологічної системи на ступінь пошкодження тромбоцитів застосовували:

програму 1 – зразок охолоджували від 22...24 до -30...-35°C зі швидкістю 1°C/хв, після чого його занурювали у рідкий азот;

програму 2 – зразок охолоджували аналогічно програмі 1, але для уникнення значного переохолодження додатково проводили температурну ініціацію кристалоутворення [7], а в інтервалі кристалізації кріобіологічної системи після зняття переохолодження застосовували контрольовану швидкість охолодження 6...7°C/хв;

програму 3 – зразок охолоджували аналогічно програмі 2, але після процедури зняття переохолодження зменшували швидкість охолодження зразка у температурному інтервалі кристалізації кріобіологічної системи до 0,2...0,3°C/хв.

solution on the platelet damage extent after cryopreservation.

Material and methods

Platelet concentrates (PCs), derived by the whole donor blood fractionation, procured with “Glygicir” preservative in “Gemakon” polymer containers (JSC “Sintez”, Russia) served the investigation material. PCs were isolated using the CRL 05-01 refrigerator centrifuge within the first 4 hours after blood procurement using the method [1]. Before experiment performance the PCs were stored at 20...24°C in “Kompoplast” containers (JSC “Sintez”, Russia) up to 18-24 hours at a constant mixing with automatic agitator (Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine) with 2 rot/min rate. PCs were cryopreserved with no cryoprotectant use and with 1.2 M DMSO solution on plasm, prepared *ex tempore* then added into PCs in 1:1 ratio. During cryoprotectant-free cryopreservation the same volume of autologous plasm was introduced into cell concentrate instead of cryoprotective solution. The final sample’s volume was 1.6 ml. Freezing was carried-out just after introducing cryoprotective solution or autologous plasm into PCs by means of programmable freezer “Cryoson” (Germany) in “Nunc” cryoampoules. The copper-constant thermocouple and “Endim 622.01” plotter (Germany) were used for freezing program recording in the standard sample.

When investigating the influence of cooling rate within the temperature range of cryobiological system crystallisation on the platelet damage extent the following programs were applied:

Program 1: the sample was cooled from 22...24 down to -30...-35°C with 1°C/min rate with following immersion into liquid nitrogen;

Program 2: the sample cooling procedure was the same as for the program 1, but in order to avoid a considerable overcooling an additional temperature initiation of crystal formation was carried-out [7], and a controlled cooling rate of 6...7°C/min was applied within the range of cryobiological system crystallisation after overcooling elimination;

Program 3: the sample cooling procedure was the same as for the program 2, but after procedure of overcooling elimination the sample cooling rate was reduced within the range of cryobiological system crystallisation down to 0.2...0.3°C/min.

When applying the programs with crystal formation temperature initiation the overcooling did not exceed 0.5...1°C.

Samples were frozen according to the mentioned programs with and without cryoprotectant.

The programs 4 and 7 were applied when studying the influence of samples’ cooling rates within temperature range of low temperature eutectic

При застосуванні програм з температурною ініціацією кристалоутворення переохолодження не перевищувало 0,5...1°C.

Заморожування зразків за вказаними програмами здійснювали з кріопротектором та без нього.

При дослідженні впливу швидкості охолодження зразків у температурному інтервалі низькотемпературного евтектичного розшарування розчину кріопротектора на ступінь пошкодження тромбоцитів застосовували програми 4-7 (таблиця).

Результати, отримані при кріоконсервуванні за програмами 4-7, порівнювали з результатами заморожування за програмою 1.

Зразки відігрівали на водяній бані при 37°C. Оцінку ступеня пошкодження клітин визначали за активністю у супернатанті цитозольних ферментів (лактатдегідрогенази (ЛДГ) та глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа (Г6ФДГ)) після центрифугування розморожених зразків при 3000 об/хв протягом 15 хв. Активність Г6ФДГ у 400 мкл бідної на тромбоцити плазми визначали в 1 мл середовища, яке містить 120 мМ Трис НСІ буфера (рН 8); 10 мМ MgCl₂; 0,9 мМ NADP; 2,0 мМ глюкозо-6-фосфату (Г6Ф) [6]. Активність ЛДГ в 50 мкл бідної на тромбоцити плазми визначали в 1 мл середовища, що містить 100 мМ Трис НСІ буфера (рН 8,8); 0,9 мМ NAD; 2,0 мМ лактату [4]. Активність ферментів реєстрували на двоохпроменевому спектрофотометрі Specord UV VIS (Німеччина) при довжині хвилі 340 нм, при температурі 37°C і постійному перемішуванні. Показники активності Г6ФДГ і ЛДГ виражали у відсотках по відношенню до показників максимального виходу цитозольних ферментів з клітин, які одержували шляхом термоциклювання зразків (заморожування без кріопротектора з зануренням у рідкий азот та відігрівання при 37°C повторювали тричі).

Статистичну обробку результатів досліджень проводили методом Стьюдента за допомогою комп'ютерної програми MS Excel.

Результати та обговорення

Кріоконсервування неодмінно призводить до пошкодження певної частини клітин і супроводжується виходом з них внутрішньоклітинних компонентів. Ступінь пошкодження тромбоцитів визначають за вмістом специфічних тромбоцитарних протеїнів [16], флуорохромів [15] та за активністю цитозольних ферментів у позаклітинному середовищі [9, 11, 13]. Найчастіше маркером кріопшкодження тромбоцитів обирають ключовий фермент гліколізу – ЛДГ, який в кров'яних пластинках має декілька ізоформ. Враховуючи те, що підвищення активності ЛДГ у кріозахисному середовищі після заморожування-відігрівання може бути зумовлене не тільки виходом ензиму з клітин, а й

Програми заморожування 4-7
Freezing programs 4-7

Програми Programs	Швидкість охолодження в температурних інтервалах, °C/хв Cooling rate within temperature range, °C/min		
	22... – 35 °C	– 35... – 70 °C	– 70... – 196 °C
4	1	0,5-1	Занурення в рідкий азот Plunging into liquid nitrogen
5	1	5-7	Занурення в рідкий азот Plunging into liquid nitrogen
6	1	10-15	Занурення в рідкий азот Plunging into liquid nitrogen
7	1	25-30	Занурення в рідкий азот Plunging into liquid nitrogen

stratification of cryoprotectant solution on platelet damage extent (Table).

The results obtained during cryopreservation by the programs 4-7 were compared with those of freezing by the program 1.

Samples were thawed on water bath at 37°C. The cell damage extent was evaluated by the activity in supernatant of lactate dehydrogenase (LDH) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) cytosol enzymes after centrifuging frozen-thawed samples at 3000 rot/min for 15 min. The G6PDH activity in 400 µl of platelet-poor plasm was determined in 1 ml of medium, comprising 120 mM Tris HCl buffer (pH 8); 10 mM MgCl₂; 0.9 mM NADP; 2.0 mM glucose-6-phosphate (G6P) [6]. LDH activity in 50 ml of platelet-poor plasm was detected in 1 ml of medium (100 µl Tris HCl buffer (pH 8.8); 0.9 mM NAD; 2.0 mM lactate) [4]. Enzyme activity was recorded with two-beam spectrophotometer Specord UV VIS (Germany) at 340 nm wavelength. Enzyme activity was determined at 37°C and a constant mixing. Indices of G6PDH and LDH activities were expressed in percentage towards the indices of cytosol enzyme maximum outcome out of cells, which were obtained via samples' thermocycling (repeated thrice cryoprotectant-free freezing with immersion into liquid nitrogen and thawing at 37°C).

Investigation results were statistically processed with by Student's method using MS Excel software.

Results and discussion

There is no doubt that cryopreservation results in damaging some part of cells and is accompanying with intracellular component release out of them. Platelet damage extent is determined by the content of specific platelet proteins [16], fluorochromes [15] and by

низькотемпературною гібридизацією, тобто переходом однієї ізоформи ферменту в іншу, при дослідженні ступеня пошкодження тромбоцитів після кріоконсервування додатково визначали активність іншого цитозольного ферменту, стійкого до дії заморожування-відігрівання Г6ФДГ [6].

Відомо, що один з відповідальних етапів кріоконсервування – охолодження біологічного об'єкта в температурному інтервалі кристалізації кріобіологічної системи, а ступінь переохолодження – один з факторів, що має визначальний вплив на результати заморожування-відігрівання. При дослідженні різних умов кріоконсервування КТ встановлено, що зменшення величини переохолодження призводить до підвищення морфофункціональної збереженості тромбоцитів [3].

Метою першого етапу нашої роботи було дослідження впливу програмного зняття переохолодження на ступінь пошкодження тромбоцитів, визначений за активністю цитозольних ферментів у позаклітинному середовищі після заморожування без кріопротектора та з 0,7 М ДМСО.

Заморожування КТ без кріопротектора за програмою 1 призводить до підвищення активності ЛДГ у плазмі у 3,5 рази, а Г6ФДГ – майже у 5 разів (рис. 1). Активність ЛДГ та Г6ФДГ після заморожування без кріопротектора за програмою 2 перевищує активність даних ферментів до заморожування відповідно в 1,9 та 2,6 рази. Кріоконсервування КТ з 0,7 М ДМСО за програмою 1 призводить до підвищення активності ЛДГ у плазмі в 1,7, а Г6ФДГ – у 2,5 рази. Активність ЛДГ та Г6ФДГ після кріоконсервування КТ з ДМСО за програмою 2 перевищує активність даних ферментів до заморожування відповідно в 1,3 та 1,6 рази. Таким чином, отримані результати свідчать, що програмне зняття переохолодження при заморожуванні без кріопротектора та в присутності ДМСО супроводжується значно меншим пошкодженням клітин, ніж заморожування без зняття переохолодження. При цьому в присутності кріопротектора сила впливу температурної ініціації кристалотворення на ступінь пошкодження клітин є помітно меншою, ніж за його відсутності. Різниця між показниками пошкодження при заморожуванні за програмами 1 та 2 за відсутності кріопротектора склала близько 25-30 %, а з ДМСО – близько 7-10%. Достовірних відмінностей між показниками пошкодження тромбоцитів після заморожування КТ без кріопротектора з програмним зняттям переохолодження та після кріоконсервування КТ з 0,7 М ДМСО без зняття переохолодження не виявлено.

Дослідження Mazur Р. довели, що власне переохолодження без кристалізації позаклітинної та внутрішньоклітинної води не призводить до пош-

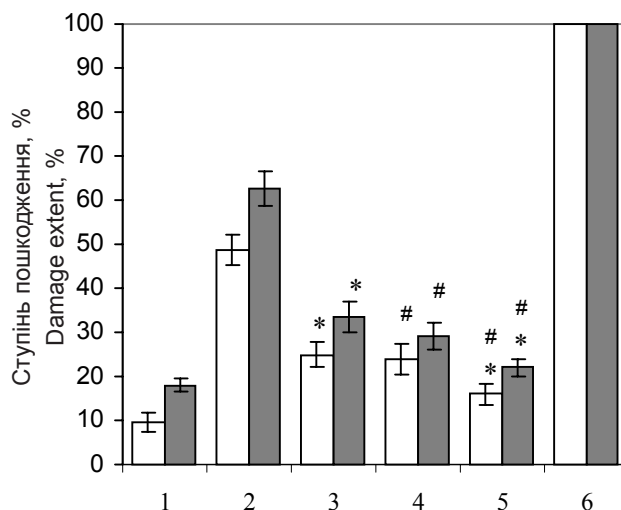


Рис. 1. Вплив заморожування КТ без кріопротектора та з 0,7 М ДМСО за програмами 1 та 2 на ступінь пошкодження тромбоцитів, визначений за активністю цитозольних ферментів у позаклітинному середовищі: ■ – ЛДГ; □ – Г6ФДГ; 1 – до заморожування; 2 – після заморожування без кріопротектора за програмою 1; 3 – без кріопротектора за програмою 2; 4 – з 0,7 М ДМСО за програмою 1; 5 – з 0,7 М ДМСО за програмою 2; 6 – після термоциклювання; * – відмінності статистично достовірні відносно показників після заморожування за програмою 1; # – відмінності статистично достовірні відносно показників після заморожування без кріопротектора за відповідною програмою.

Fig. 1. Effect of cryoprotectant-free PCs freezing and with 0.7 M DMSO by the programs 1 and 2 on platelet damage extent, determined by cytosol enzyme activity in extracellular medium: ■ – LDH; □ – G6PDH; 1 – before freezing; 2 – after cryoprotectant-free freezing by the program 1; 3 – cryoprotectant-free by the program 2; 4 – with 0.7 M DMSO by the program 1; 5 – 0.7 M DMSO by the program 2; 6 – after thermocycling; * – differences are statistically significant in respect of indices after freezing by the program 1; # – differences are statistically significant in respect of indices after cryoprotectant-free freezing by the corresponding program.

cytosol enzyme activity in extracellular medium [9, 11, 13]. A key enzyme of glycolysis: LDH, having some isoforms in blood platelets is the most often selected marker for platelet cryodamage. Taking into account that the LDH activity increase in cryoprotective medium after freeze-thawing may be stipulated not only by the enzyme release out of cells but low temperature hybridisation, i.e. the transition of one isoform into another one as well, the activity of other cytosol enzyme: G6PDH, resistant to freeze-thawing effect was additionally determined when investigating the platelet damage extent after cryopreservation [6].

Biological object cooling down within the temperature range of cryobiological system crystallisation is known to be one of responsible stages of cryopreservation, but the overcooling extent is one of the factors considerably affecting freeze-thawing results. When studying different conditions for PCs cryopreservation

кодження клітин. Однак переохолодження значно впливає на характер кристалізації в системі: від його величини залежать критичний розмір кристалічного зародка, швидкість утворення, розмір та форма кристалів [2, 5]. При заморожуванні за програмою 1, яка не передбачає процедуру зняття переохолодження, можливе пошкодження тромбоцитів як на етапі заморожування внаслідок швидкого внутрішньоклітинного кристалоутворення, так і при відігріванні в результаті рекристалізаційних процесів. Очевидно, програма 2 за рахунок зняття переохолодження знижує ймовірність внутрішньоклітинної кристалізації та забезпечує утворення більш стабільної щодо рекристалізації структури льоду.

Оскільки програма 2 передбачає не тільки зняття переохолодження, а й проходження з певною контрольованою швидкістю ($6...7^{\circ}\text{C}/\text{хв}$) всього інтервалу кристалізації кріобіологічної системи, ми дослідили вплив швидкості охолодження системи в температурному інтервалі кристалізації після зняття переохолодження на ступінь пошкодження тромбоцитів. Для цього додатково застосували програму 3, яка забезпечила зняття переохолодження та зменшення швидкості охолодження в зазначеному температурному інтервалі до $0,2...0,3^{\circ}\text{C}/\text{хв}$.

Заморожування КТ без кріопротектора за програмою 3 призводить до підвищення активності ЛДГ у зразках в 3,9 рази, а Г6ФДГ – 6 разів у порівнянні з активністю до заморожування (рис. 2). Активність ЛДГ та Г6ФДГ після кріоконсервування КТ з 0,7 М ДМСО за програмою 3 перевищує активність даних ферментів до заморожування відповідно у 2,2 та 3,8 рази. Ступінь пошкодження тромбоцитів, заморожених за програмою 3 у присутності кріопротектора та без нього виявився достовірно вищим, ніж заморожених за програмою 2. Зменшення швидкості охолодження в температурному інтервалі кристалізації системи призводить до збільшення тривалості процесу кристалізації. Очевидно, основним механізмом пошкодження клітин за цих умов є так званий “ефект розчину”, що проявляється при застосуванні субоптимальних швидкостей охолодження [12]. У присутності кріопротектора пошкоджуючий вплив “ефекту розчину” значно зменшується: різниця між показниками пошкодження при заморожуванні без кріопротектора за програмами 2 та 3 склала близько 34-37 %, а при кріоконсервуванні з ДМСО – 16-22 %.

Отже, процедура зняття переохолодження – спосіб уникнення швидкої неконтрольованої кристалізації позаклітинного розчину та зниження ймовірності внутрішньоклітинної кристалізації, що забезпечує утворення більш стабільної структури льоду. Однак результати наших досліджень

a decrease in overcooling value was established to result in platelet morphofunctional integrity rise [3].

Our research first stage was targeted to investigate the influence of overcooling programmable elimination on platelet damage extent, determined by cytosol enzyme activity in extracellular medium after cryoprotectant-free and with 0.7 M DMSO freezing.

Cryoprotectant-free PCs freezing by the program 1 results in a 3.5- and almost 5-fold activity increase in plasma for LDH and G6PDH, correspondingly. LDH and G6PDH activities after cryoprotectant-free freezing by the program 2 exceed the activity of these enzymes before freezing in 1.9 and 2.6 times, correspondingly. PCs cryopreservation with 0.7 M DMSO by the program 1 results in LDH and G6PDH activity rise in plasma in 1.7 and 2.5 times, correspondingly. LDH and G6PDH activities after PCs cryopreservation with DMSO by the program 2 exceed the activity of these enzymes before freezing in 1.3 and 1.6 times, respectively. Thus, the results obtained testify that a programmable overcooling elimination under cryoprotectant-free freezing and in DMSO presence is accompanied by a significantly lower cell damage, than freezing without overcooling elimination. At the same time, in cryoprotectant presence the influence strength of temperature initiation of crystal formation on cell damage extent is distinctly lower than under its absence. Difference between damage indices under freezing by the programs 1 and 2 with no cryoprotectant use was about 25-30% and about 7-10% for DMSO. No statistically significant differences between the platelet damage indices after cryoprotectant-free PCs freezing with a programmable overcooling elimination and after PCs cryopreservation with 0.7 M DMSO without overcooling elimination, were revealed.

Mazur revealed that the overcooling itself without extracellular and intracellular water crystallisation does not result in cell damaging. However the overcooling considerably affects the crystallisation character in the system: a critical size of crystal nucleus, formation rate, crystal size and form are dependent on its value [2, 5]. When freezing by the program 1, which does not foresee the procedure of overcooling elimination the platelet damage is possible both at freezing stage due to a rapid intracellular crystal formation and under thawing as a result of recrystallisation processes. Evidently, the program 2 due to overcooling elimination reduces the probability of intracellular crystallisation and provides the ice structure formation being more stable to recrystallisation.

Since the program 2 foresees not only the overcooling elimination but passing with the certain controlled rate ($6...7^{\circ}\text{C}/\text{min}$) through all the range of cryobiological system crystallisation as well, we have investigated the effect of system cooling rate within

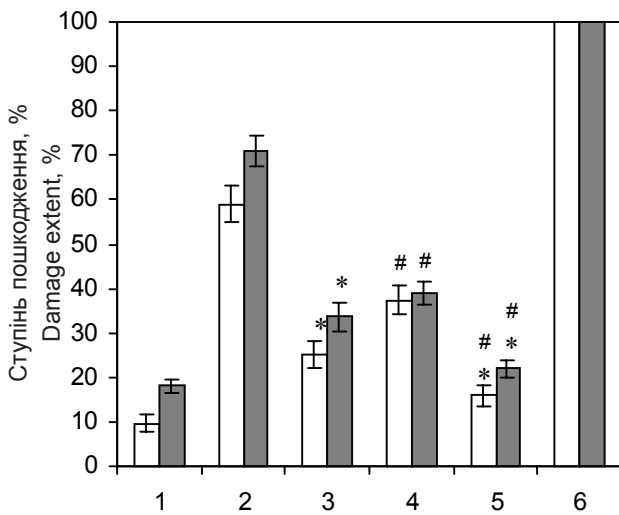


Рис. 2. Вплив криоконсервування КТ без криопротектора та з 0,7 М ДМСО за програмами 2 та 3 на ступінь пошкодження тромбоцитів, визначений за активністю цитозольних ферментів у позаклітинному середовищі: ■ – ЛДГ; □ – Г6ФДГ; 1 – до заморожування; 2 – після заморожування без криопротектора за програмою 3; 3 – без криопротектора за програмою 2; 4 – з 0,7 М ДМСО за програмою 3; 5 – з 0,7 М ДМСО за програмою 2; 6 – після термоцикловання; * – відмінності статистично достовірні відносно показників після заморожування за програмою 3, $p < 0,05$; # – відмінності статистично достовірні відносно показників після заморожування без криопротектора за відповідною програмою, $p < 0,05$.

Fig. 2. Effect of cryoprotectant-free PCs freezing and with 0.7 M DMSO by the programs 2 and 3 on platelet damage extent, determined by cytosol enzyme activity in extracellular medium: ■ – LDH; □ – G6PDH; 1 – before freezing; 2 – after cryoprotectant-free freezing by the program 3; 3 – cryoprotectant-free by the program 2; 4 – with 0.7 M DMSO by the program 3; 5 – 0.7 M DMSO by the program 2; 6 – after thermocycling; * – differences are statistically significant in respect of indices after freezing by the program 3; # – differences are statistically significant in respect of indices after cryoprotectant-free freezing by the corresponding program, $p < 0.05$.

довели, що зняття переохолодження без регулювання швидкості проходження інтервалу кристалізації кріобіологічної системи після зняття переохолодження не має позитивного впливу на збереженість клітин. Тільки поєднання зняття переохолодження з певною контрольованою швидкістю охолодження в даному температурному інтервалі може забезпечити істотне зниження ступеня пошкодження кров'яних пластинок.

Дослідження останніх років виявили явище низькотемпературного евтектичного розшарування розчинів криопротекторів. Зроблено припущення, що даний фізичний чинник може викликати летальні пошкодження кріолабільних клітин [10].

Метою другого етапу досліджень було вивчення впливу швидкості охолодження зразків у інтервалі низькотемпературного евтектичного розшарування розчину ДМСО на ступінь пошкодження тромбоцитів.

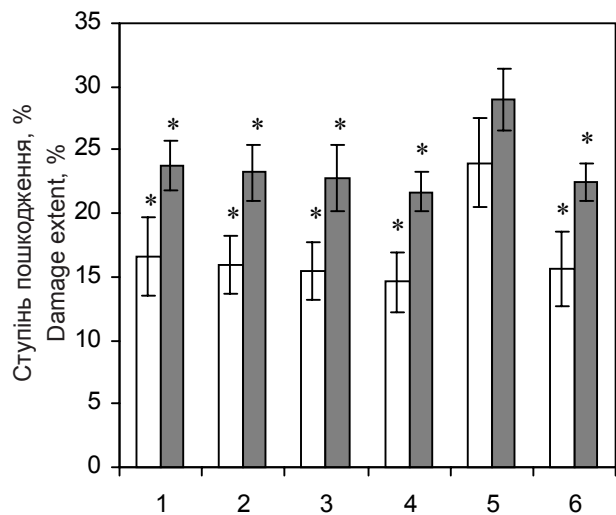


Рис. 3. Вплив криоконсервування КТ з 0,7 М ДМСО за програмами 1, 4, 5, 6, 7 на ступінь пошкодження тромбоцитів, визначений за активністю цитозольних ферментів у позаклітинному середовищі: ■ – ЛДГ; □ – Г6ФДГ; 1 – після заморожування за програмою 4; 2 – за програмою 5; 3 – за програмою 6; 4 – за програмою 7; 5 – за програмою 1; * – відмінності статистично достовірні відносно показників після заморожування за програмою 1, $p < 0,05$.

Fig. 3. Effect of PCs freezing with 0.7 M DMSO by the programs 1, 4, 5, 6, 7 on platelet damage extent, determined by cytosol enzyme activity in extracellular medium: ■ – LDH; □ – G6PDH; 1 – after freezing by the program 4; 2 – by the program 5; 3 – by the program 6; 4 – by the program 7; 5 – by the program 1; * – differences are statistically significant in respect of indices after freezing by the program 1; # – differences are statistically significant in respect of indices after freezing by the program 1, $p < 0.05$.

the crystallisation temperature range after overcooling elimination on the platelet damage extent. For this purpose we additionally applied the program, providing the overcooling elimination and cooling rate reduction within the mentioned temperature range down to 0.2...0.3°C/min.

Cryoprotectant-free PCs freezing by the program 3 results in the LDH and G6PDH activity increase in samples by 3.9 and 6 times, correspondingly, compared to the activity before freezing (Fig. 2). LDH and G6PDH activities after PCs cryopreservation with 0.7 M DMSO by the program 3 exceed these enzymes activity before freezing by 2.2 and 3.8 times, correspondingly. The damage extent of platelets, frozen by the program 3 with/without cryoprotectant was revealed as statistically and significantly higher than in those frozen by the program 2. Cooling rate decrease within the temperature range of system crystallisation augments the crystallisation process duration. Evidently, the principle mechanism of cell damage under these conditions is so-called “solution effect”, manifesting under suboptimal cooling rates application [12]. In cryoprotectant presence a damaging influence of “solution effect” considerably decreases: a difference between damage indices under

При підвищенні швидкості охолодження в температурному інтервалі низькотемпературного евтектичного розшарування розчину кріопротектора спостерігається тенденція до зменшення ступеня пошкодження тромбоцитів після заморожування-відігрівання, але швидкість, яка реалізується при прямому зануренні зразка у рідкий азот, є занадто великою, про що свідчать результати заморожування за програмою 1 (рис. 3). Оптимальну швидкість проходження даного температурного інтервалу при кріоконсервуванні КТ з ДМСО забезпечує застосування програми 7. Не виявлено достовірних відмінностей між показниками пошкодження тромбоцитів після кріоконсервування КТ з ДМСО за програмами 2 та 4-7.

Подальшою метою нашої роботи буде одержання оптимального режиму кріоконсервування кров'яних пластинок за рахунок поєднання програмного зняття переохолодження з контрольованою швидкістю охолодження в інтервалах кристалізації кріобіологічної системи та низькотемпературного евтектичного розшарування розчину кріопротектора.

Висновки

1. Отримані результати свідчать про значний вплив швидкості охолодження в температурних інтервалах кристалізації кріобіологічної системи та низькотемпературного евтектичного розшарування розчину кріопротектора на результати кріоконсервування тромбоцитів крові людини.

2. Поєднання програмного зняття переохолодження з певною контрольованою швидкістю проходження температурного інтервалу кристалізації кріобіологічної системи істотно підвищує ефективність кріоконсервування, особливо за відсутності кріопротектора.

3. Порівняльний аналіз результатів заморожування КТ за різними режимами охолодження свідчить, що ефект зниження ступеня пошкодження клітин за рахунок поєднання зняття переохолодження з певною швидкістю проходження температурного інтервалу кристалізації кріобіологічної системи при кріоконсервуванні КТ без кріопротектора дорівнює ефекту заморожування КТ у присутності 0,7 М ДМСО з постійною швидкістю.

4. Ефект зменшення пошкодження тромбоцитів у результаті охолодження з певною контрольованою швидкістю в температурному інтервалі низькотемпературного евтектичного розшарування розчину кріопротектора порівняний з ефектом зниження пошкодження клітин внаслідок поєднання зняття переохолодження і певної швидкості проходження температурного інтервалу кристалізації кріобіологічної системи.

cryoprotectant-free freezing by the programs 2 and 3 was about 34-37%, but it was 16-22% under cryopreservation with DMSO.

Thus, the procedure of overcooling elimination is the way to avoid a rapid non-controlled extracellular solution crystallisation and to reduce the probability for intracellular crystallisation, providing the more stable ice structure formation. However the results of our research have proved that the overcooling elimination without controlling the rate of passing through the range of cryobiological system crystallisation after overcooling eliminating does not positively affect cell integrity. Only combining the overcooling elimination with certain controlled cooling rate within this temperature range may provide an essential decrease in platelet damage extent.

Recent researches have revealed the phenomenon of low temperature eutectic stratification of cryoprotective solutions. There was assumed that this physical factor might cause the lethal damages in cryolabile cells [10].

The second stage was aimed to study the influence of samples' cooling rate within the range of low temperature eutectic stratification of DMSO solution on the platelet damage extent. When increasing cooling rates within temperature range of low temperature eutectic stratification of cryoprotective solution there is observed the tendency to reduce the platelet damage extent after freeze-thawing, but the rate, realised at a direct sample immersion into liquid nitrogen is too high, that is testified by the results of freezing with the program 1 (Fig. 3). The optimal rate of passing through this temperature range under PCs cryopreservation with DMSO is provided by applying the program 7. No statistically significant differences between the indices of platelet damage after PCs cryopreservation with DMSO by the programs 2 and 4-7 were revealed.

Our further research will be aimed to obtain the optimal regimen for platelet cryopreservation due to combining a programmable overcooling elimination with a controlled cooling rate within the range of cryobiological system crystallisation and low temperature eutectic stratification of cryoprotective solution.

Conclusions

1. The results obtained testify to a significant effect of cooling rate within temperature range of cryobiological system crystallisation and low temperature eutectic stratification of cryoprotective solution on the results of human blood platelet cryopreservation.

2. Combining a programmable overcooling elimination with certain controlled rate of transition thorough temperature range of cryobiological system crystallisation significantly augments cryopreservation efficiency, especially under cryoprotectant absence.

5. Розробка оптимального режиму кріоконсервування КТ можлива лише з урахуванням ефектів, що виникають в обох вищезазначених температурних інтервалах і за умови їх проходження з певною швидкістю охолодження.

Література

1. *Аграненко В.А., Компаниец А.М., Балежина Л.В. и др.* Выделение концентратов тромбоцитов из ЛТС донорской крови и их консервирование // Гематология и трансфузиология. – 1991. – Т. 36, №3. – С. 29-32.
2. *Белюс А.М., Гордиенко Е.А., Розанов Л.Ф.* Замораживание и криопротекция. – М.: Высш. шк., 1987. – 80 с.
3. *Компаниец А.М.* Консервирование концентратов тромбоцитов и их лечебная эффективность: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – М., 1992. – 52 с.
4. *Лемешко В.В., Нікітченко Ю.В., Троянова В.Н.* Особливості ішемічного пошкодження мембран та активація перекисного окислення ліпідів у міокарді щурів різного віку // Укр. біохім. журн. – 1989. – Т. 61, №2. – С. 98-105.
5. *Новиков А.Н., Вепринцев Б.Н., Утешев В.К. и др.* Влияние переохлаждения и криопротекторов на внутриклеточную кристаллизацию в зародышах вьюна // Пробл. криобиологии. – 1992. – №3. – С. 27-32.
6. *Родионова В.Л., Нікітченко Ю.В., Чуб Н.Н., Черепанов В.В.* Сукцинатдегидрогеназная и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназная активность спермы человека на этапах низкотемпературного консервирования // Пробл. криобиологии. – 2005. – Т.15, №2. – С. 207-211.
7. *Пат. № 4523 Україна.* МПК7 А0N 1/02. Спосіб кріоконсервування суспензії клітин ембріональної нервової тканини / В.І. Грищенко, А.М. Гольцев, Т.М. Гурина, Н.М. Бабенко / Заявлено 24.05.04; Опубл. 17.01.05. – Бюл. № 1.
8. *Balint B., Paunovic D., Vucetic D. et al.* Controlled-rate versus uncontrolled-rate freezing as predictors for platelet cryopreservation efficacy // Transfusion. – 2006. – Vol.46, N3. – P. 230-235.
9. *Gulliksson H.* Adenylate kinase as a marker for platelet lysis // Transfusion. – 1990. – Vol. 30, N6. – P. 536-540.
10. *Kyryliuk G.L., Osetsky A.I., Gurina T.M.* Physical substantiation of three-step freeze-thawing as optimal regimen for changing temperature during biological system cryopreservation // Proceedings of the 43rd Meeting of the Society for Cryobiology. – Hamburg, 2006. – P. 15.
11. *Landi E.P., Roveri E.G., Ozelo M.C. et al.* Effects of high platelet concentration in collecting and freezing dry platelets concentrates // Transfus. Apher. Sci. – 2004. – Vol. 30, N3. – P. 205-212.
12. *Mazur P.* The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates // Cryobiology. – 1977. – Vol. 14, N2. – P. 251-272.
13. *Quyang X.L., Liu J.H., Pan J.C. et al.* Quantitative analysis of batch preparing cryopreserved fresh platelet rich plasma // Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. – 2004. – Vol. 12, N6. – P. 841-844.
14. *Reid T.J., Gao D.* Symposium on cryopreservation of human platelets: an overview. Held at the 35th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Pittsburgh, Pennsylvania, July 16, 1998 // Cryobiology. – 1999. – Vol. 38, N3. – P. 177-179.
15. *Reid T.J., LaRussa V.F., Esteban G. et al.* Cooling and freezing damage platelet membrane integrity // Cryobiology. – 1999. – Vol. 38, N3. – P. 209-224.
16. *Taylor M.A.* Release of β -thromboglobulin during the preparation, *in vitro* storage and cryopreservation of platelet concentrates // J. Clin. Pathol. – 1983. – Vol. 36, N7. – P. 811-815.

Надійшла 05.02.2007.

3. A comparative analysis of PCs freezing results with different cooling regimens testifies to the fact, that the effect of decrease in cell damage extent due to combining the overcooling elimination with certain rate of transition through temperature range of cryobiological system crystallisation under PCs cryopreservation without cryoprotectant is equal to the effect of PCs freezing in 0.7 M DMSO presence with constant rate.

4. The effect of decrease in platelet damage as a result of cooling with certain controlled rate within temperature range of low temperature eutectic stratification of cryoprotective solution is comparable to that of decrease in cell damage as a result of combining overcooling elimination and certain rate of transition through temperature range of cryobiological system crystallisation.

5. Elaboration of optimal regimen for PCs cryopreservation is only possible if taking into account the effects, occurred in both mentioned above temperature ranges and when passing through them with certain cooling rate.

References

1. *Agranenko V.A., Kompaniets A.M., Balezina L.V. et al.* Isolation of platelet concentrates out of donor blood LTS and their preservation // Gematol. Transfusiol. – 1991. – Vol. 36, N3. – P. 29-32.
2. *Belous A.M., Gordienko E.M., Rozanov L.F.* Freezing and cryoprotection. – Moscow: Vysshaya shkola, 1987. – 80 p.
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. *Lemeshko V.V., Nikitchenko Yu.V., Troyanova V.N.* Peculiarities of ischemic membrane damage and lipid peroxidation activation in myocardium of rats of different age // Ukr. Biokhim. Zhurn. – 1989. – N2. – P. 98-105.
5. *Novikov A.N., Vepintsev B.N., Uteshev V.K. et al.* The effects of supercooling and cryoprotectants on the intracellular crystallization in loach embryos // Problems of Cryobiology. – 1992. – N3. – P. 27-32.
6. *Rodionova V.L., Nikitchenko Yu.V., Tchoob N.N., Cherepanov V.V.* Succinate-dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities of human sperm at low temperature preservation stages // Problems of Cryobiology. – 2005. – N2. – P. 207-211.
7. *Patent N 4523 Ukraine* IPC7 A0N 1/02. Cryopreservation way for embryonic nerve tissue cell suspension / V.I. Grischenko, A.M. Goltsev, T.M. Gurina, N.M. Babenko / Applied 24.05.04; Published 17.01.05. – Bull. N1.
8. *Balint B., Paunovic D., Vucetic D. et al.* Controlled-rate versus uncontrolled-rate freezing as predictors for platelet cryopreservation efficacy // Transfusion. – 2006. – Vol.46, N3. – P. 230-235.
9. *Gulliksson H.* Adenylate kinase as a marker for platelet lysis // Transfusion. – 1990. – Vol. 30, N6. – P. 536-540.
10. *Kyryliuk G.L., Osetsky A.I., Gurina T.M.* Physical substantiation of three-step freeze-thawing as optimal regimen for changing temperature during biological system cryopreservation // Proceedings of the 43rd Meeting of the Society for Cryobiology. – Hamburg, 2006. – P. 15.
11. *Landi E.P., Roveri E.G., Ozelo M.C. et al.* Effects of high platelet concentration in collecting and freezing dry platelets concentrates // Transfus. Apher. Sci. – 2004. – Vol. 30, N3. – P. 205-212.

12. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates // *Cryobiology*.– 1977.– Vol. 14, N2.– P. 251-272.
13. Quyang X.L., Liu J.H., Pan J.C. et al. Quantitative analysis of batch preparing cryopreserved fresh platelet rich plasma // *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*.– 2004.– Vol. 12, N6.– P. 841-844.
14. Reid T.J., Gao D. Symposium on cryopreservation of human platelets: an overview. Held at the 35th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Pittsburgh, Pennsylvania, July 16, 1998 // *Cryobiology*.– 1999.– Vol. 38, N3.– P. 177-179.
15. Reid T.J., LaRussa V.F., Esteban G. et al. Cooling and freezing damage platelet membrane integrity // *Cryobiology*.– 1999.– Vol. 38, N3.– P. 209-224.
16. Taylor M.A. Release of β -thromboglobulin during the preparation, *in vitro* storage and cryopreservation of platelet concentrates // *J. Clin. Pathol.*– 1983.– Vol. 36, N7.– P. 811-815.

Accepted in 05.02.2007