

Криоконсервирование концентратов тромбоцитов в комбинированных консервантах при разных температурных режимах ($-70...-80$ и -196°C)

А.В. Коробкова, А.М. Компаниец

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryopreservation of Platelet Concentrates in Combined Preservatives at Different Temperature Regimens ($-70...-80$ and -196°C)

A.V. Korobkova, A.M. Kompaniets

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

Цель работы — изучение сохранности концентрата тромбоцитов после криоконсервирования при умеренно низкой ($-70...-80^{\circ}\text{C}$) и низкой (-196°C) температурах с применением комбинированных криоконсервантов.

Концентрат тромбоцитов (КТ) получали дифференцированным центрифугированием отдельных доз донорской крови методом из лейкотромбоцитарного слоя. Замораживание образцов осуществляли после 30-минутной экспозиции с криозащитными средами, содержащими 10%-ю суммарную концентрацию смеси диметилацетамид (ДМАц)/оксиэтилированный глицерин со степенью полимеризации $n = 5$ (ОЭГ _{$n=5$}), ДМАц/глицерин или ДМАц/1,2-пропандиол (1,2-ПД) в плазме, а также 10% диметилсульфоксида (ДМСО) в плазме. Суспензию тромбоцитов охлаждали в полимерных (фторопласт) контейнерах вместимостью 10 мл по следующим режимам: в механическом холодильнике при температуре $-70...-80^{\circ}\text{C}$ (режим 1); в парах жидкого азота при температуре $-188...-193^{\circ}\text{C}$ с последующим хранением при -196°C (режим 2); в механическом холодильнике при $-70...-80^{\circ}\text{C}$, хранением при -196°C (режим 3); в парах жидкого азота при $-188...-193^{\circ}\text{C}$ до температуры -70°C с последующим хранением при $-70...-80^{\circ}\text{C}$ (режим 4). Образцы отогревали на водяной бане при 37°C . Функциональную полноценность криоконсервированных тромбоцитов оценивали после удаления криопротекторов по следующим показателям: агрегация, индуцированная аденазин-дифосфорной кислотой динатриевой солью (200×10^{-6} и 50×10^{-6} М) и коллагеном ($6,7 \times 10^{-3}$ М), реакция на гипотонический шок, ретракция сгустка; подсчитывали количество тромбоцитов в КТ.

Установлен высокий уровень сохранности функциональных свойств КТ при использовании всех комбинированных криоконсервантов и режимов охлаждения 2 и 4, независимо от конечной температуры замораживания и хранения (-196 и $-70...-80^{\circ}\text{C}$). Наиболее высокие результаты получены для криоконсерванта ДМАц/ОЭГ _{$n=5$} . После охлаждения и хранения образцов КТ в механическом холодильнике (режим 1) уровень сохранности таких параметров, как реакция на гипотонический шок, ретракция, коллаген-индуцированная агрегация был несколько ниже, однако значимо не отличался от результатов криоконсервирования тромбоцитов с ДМСО.

Результаты данной серии исследований указывают на то, что использование комбинации криопротекторов в криоконсервантах и более высоких скоростей охлаждения суспензии тромбоцитов до температуры -70°C позволит повысить результаты их криоконсервирования при умеренно низкой ($-70...-80^{\circ}\text{C}$) температуре.

The research was targeted to study the integrity of platelet concentrate after cryopreservation under moderately low and low temperatures ($-7...-80$ and -196°C , respectively) with applying combined cryopreservatives.

Platelet concentrate (PC) was procured by differentiated centrifugation of single samples of donor blood from buffy coat. Samples were frozen after 30 min exposure with cryoprotective media, containing 10% total concentration of combinations of dimethyl acetamide (DMAc)/oxyethylated glycerol with polymerization degree $n = 5$ (OEG _{$n=5$}), DMAc/glycerol or DMAc/1,2-propane diol (1,2-PD) in plasm, as well as 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) in plasm. Platelet suspension was cooled in 10 ml polymer (fluoroplast) containers according the following regimens: in mechanical refrigerator at $-70...-80^{\circ}\text{C}$ (regimen 1); in liquid nitrogen vapors at $-188...-193^{\circ}\text{C}$ with following storage at -196°C (regimen 2); in mechanical refrigerator at $-70...-80^{\circ}\text{C}$ and stored at -196°C (regimen 3); in liquid nitrogen vapors at $-188...-193^{\circ}\text{C}$ to -70°C with further storage at $-70...-80^{\circ}\text{C}$ (regimen 4). Samples were thawed in water bath at 37°C . Functional integrity of cryopreserved platelets was assessed after cryoprotectant removal by following indices: ADP- and collagen-induced aggregations (200×10^{-6} and 50×10^{-6} M) and ($6,7 \times 10^{-3}$ M), respectively), response to hypotonic shock, clot retraction; counting platelet number in PC.

There was established a high number of the integrity of PC functional properties when using the whole combined cryopreservatives and cooling regimens 2 and 4 independently on final temperature of freezing and storage (-196 and $-70...-80^{\circ}\text{C}$). The highest results were obtained for cryopreservative DMAc/OEG _{$n=5$} . After PC samples cooling and storage in mechanical refrigerator (regimen 1) the level of such parameters as response to hypotonic shock, collagen-induced aggregation was slightly lower, but not significantly different from the results of platelet cryopreservation with DMSO.

The findings of this experimental series indicate the fact, that the use of combined cryopreservatives and higher rates of platelet suspension cooling down to -70°C enabled to improve the results of their cryopreservation under moderately low temperature ($-70...-80^{\circ}\text{C}$).

