

Замораживание тромбоцитов в криозащитных средах, содержащих различные комбинации криопротекторов

UDC 57.043:547.42

О.А. BOGDANCHIKOVA, T.M. GURINA, A.M. KOMPANIETS*

Blood Platelet Freezing Under Cryoprotective Media with Different Combinations of Cryoprotectants

Концентраты тромбоцитов, замороженные и сохраняемые по существующим методам при низкой (-80°C) и ультранизкой (-196°C) температурах, не находят широкого применения в лечебной практике из-за недостаточной их морфофункциональной сохранности и низкой лечебной эффективности. Одной из основных задач при криоконсервировании тромбоцитов является выбор криопротектора и создание на его основе эффективного криозащитного раствора.

Цель работы – исследование криозащитной эффективности сред, содержащих комбинации криопротекторов, при замораживании тромбоцитов.

Материалы и методы

Концентрат тромбоцитов (КТ) получали из отдельных доз донорской крови, заготовленной на консерванте «Глюгидир» из лейкотромбоцитарного слоя (ЛТС) с применением рефрижераторной центрифуги [1]. Перед замораживанием КТ хранили при $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение 20–24 ч при постоянном перемешивании на автоматической мешалке со скоростью 2 об/мин.

При замораживании КТ использовали ограждающие среды, содержащие растворы криопротекторов, принадлежащих к разным классам химических соединений – спиртов и амидов. Исследовали следующие комбинации криопротекторов, приготовленные на аутологичной плазме: 1) диметилсульфоксид (ДМСО) конечная концентрация 0,7 М; 2) 1,2-пропандиол (1,2-ПД) 0,35 М и оксиэтилированный глицерин со степенью полимеризации $n=5$ (ОЭГ ($n=5$)) 0,09 М; 3) 1,2-ПД 0,35 М и глицерин 0,35 М; 4) диметилацетамид (ДМАЦ) 0,35 М и ОЭГ ($n=5$) 0,09 М; 5) ДМАЦ 0,35 М и глицерин 0,35 М; 6) ДМАЦ 0,35 М и 1,2-ПД 0,35 М. Ограждающие растворы соединяли с образцами КТ в соотношении 1:1 в течение 3 мин. Время экспози-

Platelet concentrates, frozen and preserved according to the current methods under low (-80°C) and ultralow (-196°C) temperatures, have not been widely applied in therapeutic practice due to their insufficient morphofunctional integrity and low therapeutic efficiency. One of the principal tasks in platelet cryopreservation is to select a cryoprotectant and design an efficient cryoprotective solution on its base.

The research was targeted to study a cryoprotective efficiency of media, containing cryoprotectant combination under blood platelet freezing.

Materials and methods

Platelet concentrate (PC) was procured from separate doses of donor's blood, prepared with "Glygicir" preservative from a leuko-thrombocyte layer (LTL) with applying cold centrifuge [1]. Prior to freezing the BPC was stored at $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ within 20–24 hrs under constant mixing using automatic mixer with 2 rot/min rate.

The restricting media, containing cryoprotective solutions, belonging to different classes of chemical compounds: alcohols and amides, were used under BPC freezing. There were studied the following cryoprotective combinations, prepared with autologous plasm: 1) dimethyl sulfoxide (DMSO) of 0.7 M final concentration; 2) 1,2-propane diol (1,2-PD) 0.35 M and oxyethylated glycerol with polymerisation degree $n=5$ (OEG ($n=5$)) 0.09 M; 3) 1,2-PD 0.35 M and glycerol 0.35 M; 4) dimethyl acetamide (DMAC) 0.35 M and OEG ($n=5$) 0.09 M; 5) DMAC 0.35 M and glycerol 0.35 M; 6) DMAC 0.35 M and 1,2-PD 0.35 M. Restricting solutions were combined with PC in 1:1 ratio for 3 min. Exposure time was 30 min. Restricting media N2, 3, 4 and 5 were investigated under gradual adding cryoprotectants before freezing. Thus, we combined BPC samples with solutions of either slowly penetrating 0.35 M glycerol or 0.09 M non-penetrating OEG ($n=5$), thereat the exposure time was 20 min, then either 0.35

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

ции составляло 30 мин. Ограждающие среды №2, 3, 4 и 5 исследовали при последовательном добавлении криопротекторов перед замораживанием. Так, образцы КТ соединяли с растворами медленно проникающего глицерина 0,35 М или непроникающего ОЕГ (n=5) 0,09 М, при этом время экспозиции составляло 20 мин, затем добавляли 1,2-ПД 0,35 М или ДМАЦ 0,35 М и дополнительно выдерживали суспензию клеток 10 мин. Образцы замораживали с помощью программного замораживателя «Cryoson» (Германия) со скоростью 1°C/мин до -40°C с последующим погружением в жидкий азот в пластиковых пакетах прямоугольной формы размером 30×100 мм на основе фторопласта. Объем образца составил 6 мл, толщина замораживаемого слоя – 2–3 мм. Такая геометрия позволяет практически полностью исключить переохлаждение в замораживаемых образцах за счет оригинальных металлических сеточных холдеров для пакетов с биообъектом и специального их расположения в охлаждаемом потоке относительно направления его движения. Образцы отогревали на водяной бане при 37°C с постоянным покачиванием, после чего количественно оценивали сохранность тромбоцитов методом световой микроскопии [2]. Оценку функциональной полноценности тромбоцитов проводили после удаления криопротектора методом, разработанным в ИПКиК НАНУ [4]. Регистрацию реакции на гипотонический шок (РГШ) и агрегации тромбоцитов осуществляли фотометрическим методом [5] с помощью анализатора “Colysagraph” (США) с графической регистрацией изменений оптической плотности суспензии на самописце “Endim” 622.01 (Германия). В качестве индуктора агрегации использовали раствор коллагена в конечной концентрации 20 мг/мл (производство “Технология-СТАНДАРТ”, Россия). Ретрактильную активность тромбоцитов определяли по методу, описанному в [3]. Полученные показатели количества кровяных пластинок, агрегации, РГШ и ретрактильной активности выражали в процентах по отношению к соответствующим показателям для свежесыворотных тромбоцитов. Статистическую обработку полученных данных проводили по методу Стьюдента с помощью программы Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

При анализе концентрации тромбоцитов в образцах после замораживания-оттаивания наблюдалось снижение количества клеток от 6 до 38%. Наибольшее количество кровяных пластинок сохранялось после замораживания с использованием криозащитных сред в следующих комбинациях криопротекторов: ДМАЦ и ОЭГ (n=5) при последовательном введении криопротекторов

М 1,2-PD or 0.35 M DMAC were added with additional 10 min cell suspension exposure. Samples were frozen with programmed freezer “Cryoson” (Germany) with 1°C/min rate down to -40°C with following immersion into liquid nitrogen in 30×100 mm rectangular plastic bags on fluoroplast base. Sample volume and thickness of frozen layer were 6 ml and 2–3 mm, correspondingly. Such geometry enables quite a complete overcooling exclusion in frozen samples due to original metal mesh holders for bags with bioobject and their special placing in a cooling stream in respect of its movement orientation. Samples were thawed on water bath at 37°C with a constant shaking, then the platelet integrity was quantitatively estimated using the light microscopy method [2]. Platelet functional integrity was estimated after cryoprotectant removal using the method, designed at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine [4]. Hypotonic stress response (HSR) and platelet aggregation were photometrically registered [5] using the “Colysagraph” analyser (USA) with graphic recording the changes in suspension optical density with “Endim” 622.01 plotter (Germany). Collagen solution in 20 mg/ml final concentration (produced by “Tekhnologiya-STANDART”, Russia) was used as aggregation inducer. Platelet retractile activity was determined by the method, described in the paper [3]. The obtained indices of blood platelet number, aggregation, HRS and retractile activity were expressed in percentage in respect of corresponding indices for freshly isolated platelets. The data obtained were statistically processed using the Student method with Microsoft Excel software.

Results and discussion

When analysing blood platelet concentration in samples after freeze-thawing a decrease in cell number from 6 to 38% was observed. The highest number of blood platelets was preserved after freezing with using cryoprotective media in the following combinations of cryoprotectants: DMAC and OEG (n=5) under gradual introduction of cryoprotectants (94.5±3.5%); DMAC and OEG (n=5) under combined introduction (84.9±5.0%); DMAC and glycerol under subsequent introduction (85.4±3.6%); DMAC and glycerol under combined introduction (81.1±12.0%); as well as DMAC and 1,2-PD under combined introduction (86.0±6.0%). Of note is that no distinct dependency of platelet integrity on cryoprotectant introduction way was revealed.

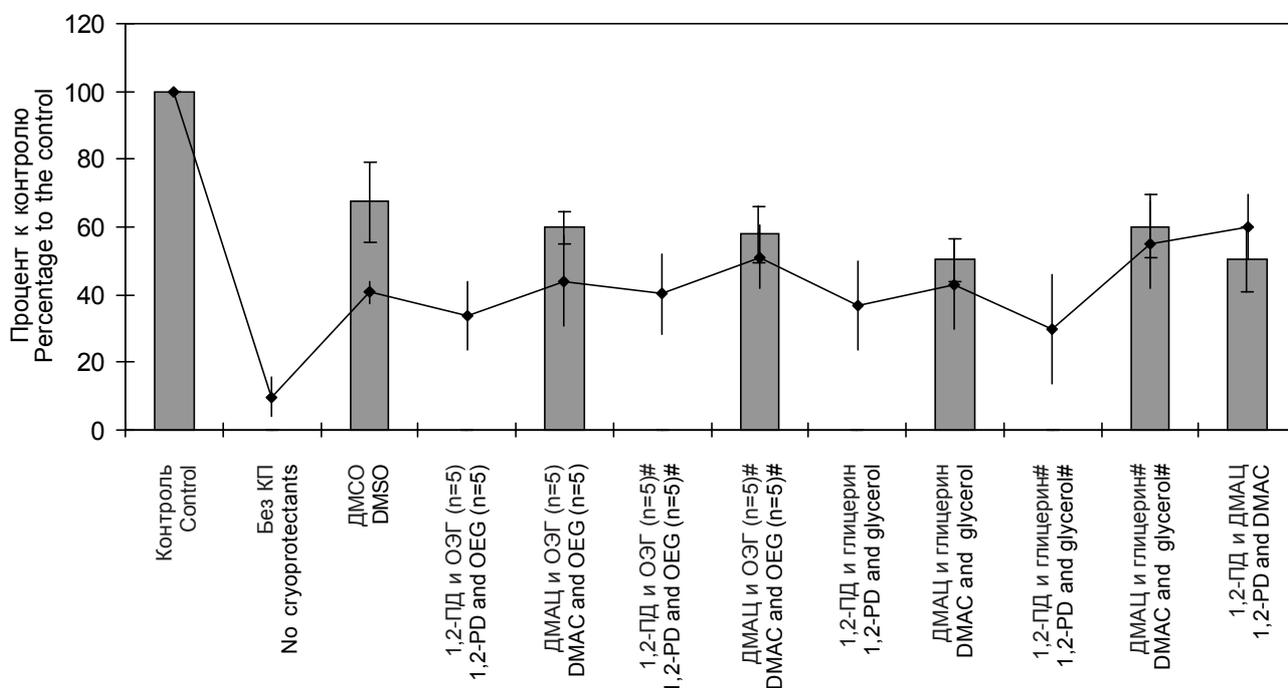
The same tendency is observed when comparing the integrity indices of platelet specific functions: retraction, aggregation and HRS. The platelet ability for clot retraction was preserved after PC freezing with cryoprotective media, containing DMAC and OEG (n=5), DMAC and glycerol, both under combined

(94,5±3,5%); ДМАЦ и ОЭГ (n=5) при совместном введении (84,9±5,0%); ДМАЦ и глицерин при последовательном введении (85,4±3,6%); ДМАЦ и глицерин при совместном введении (81,1±12,0%), а также ДМАЦ и 1,2-ПД при совместном введении (86,0±6,0%). Следует отметить, что четкой зависимости сохранности тромбоцитов от способа введения криопротекторов не выявлено.

Подобная тенденция наблюдается при сравнении показателей сохранности специфических функций тромбоцитов: ретракции, агрегации и РГШ. Способность тромбоцитов к ретракции сгустка сохранялась после замораживания КТ с криозащитными средами, содержащими ДМАЦ и ОЭГ (n=5), ДМАЦ и глицерин, как при совместном, так и при последовательном добавлении растворов криопротекторов в суспензию тромбоцитов. После криоконсервирования КТ с другими исследованными растворами ретрактивная активность тромбоцитов в данной серии экспериментов отсутствовала. Наибольшая сохранность степени РГШ установлена после замораживания тромбоцитов под защитой комбинаций ДМАЦ и глицерина (60,2%), ДМАЦ и ОЭГ (n=5) (51,0%) при последовательном введении криопротекторов, а также ДМАЦ и 1,2-ПД (60,0%). Полученные данные достоверно выше показателей РГШ для тромбоцитов, криоконсервированных со средой на основе 0,7 М ДМСО (40,7%). Показатели РГШ после заморажи-

and subsequent addition of cryoprotective solutions into platelet suspension. After PC cryopreservation with other studied solutions there was no retractile activity of blood platelets in this experimental series. The highest integrity of RHS degree was established after platelet freezing under protection of combinations: DMAC and glycerol (60.2%), DMAC and OEG (n=5) (51.0%) under subsequent introduction of cryoprotectants, as well as DMAC and 1,2-P (60.0%) (Figure). The data obtained are statistically and significantly higher than RHS indices for platelets, cryopreserved with the medium, based on 0.7 M DMSO (40.7%). The HRS indices after freezing with other restricting media, studied in this research, were lower and did not statistically and significantly differ from the corresponding indices for platelets, cryopreserved with DMSO. There was observed a resistant tendency to an increase in HRS degree preservation under subsequent introduction at first of either slowly penetrating glycerol or non-penetrating OEG (n=5), then penetrating cryoprotectants: DMAC or 1,2-PD in platelet suspension before freezing.

The highest indices of aggregation preservation were established for platelets, frozen only with DMSO (67.4%) (Figure), as well as with cryoprotective medium, containing DMAC and glycerol under subsequent introduction of cryoprotectants (60.2%). High indices of aggregation were preserved when using DMAC and OEG (n=5) combination both under



Агрегация и РГШ тромбоцитов после замораживания в криозащитных средах, содержащих различные комбинации криопротекторов: ■ – агрегация; ◆ – РГШ; # – обозначены среды, исследованные при последовательном введении криопротекторов.

Platelet aggregation and RHS after freezing in cryoprotective media, containing different combinations of cryoprotectants; ■ – aggregation; ◆ – RHS; # – cryoprotective media combinations, studied under subsequent cryoprotectant introduction.

вания с другими исследуемыми в данной работе ограждающими средами были ниже и достоверно не отличались от соответствующих показателей для тромбоцитов, криоконсервированных с ДМСО. Наблюдается стойкая тенденция к увеличению сохранности степени РГШ при последовательном введении вначале медленно проникающего глицерина или непроникающего ОЭГ (n=5), а затем проникающих криопротекторов – ДМАЦ или 1,2-ПД в суспензию тромбоцитов до замораживания.

Наиболее высокие показатели сохранности агрегации установлены для тромбоцитов, замороженных только с ДМСО (67,4%) (рисунок), а также с криозащитной средой, содержащей ДМАЦ и глицерин при последовательном введении криопротекторов (60,2%). Высокие показатели агрегации сохранялись при использовании комбинаций ДМАЦ и ОЭГ (n=5) как при совместном (59,9%), так и при последовательном добавлении криопротекторов (57,8%), а также ДМАЦ и 1,2-ПД (50,6%). Достоверных отличий между показателями степени агрегации тромбоцитов, замороженных с применением вышеперечисленных сред и способов их введения, не выявлено. Способность кровяных пластинок к агрегации при введении индуктора коллагена после криоконсервирования под защитой сред, содержащих 1,2-ПД и глицерин или 1,2-ПД и ОЭГ (n=5), отсутствовала.

Выводы

При замораживании тромбоцитов установлено выраженное криозащитное действие многокомпонентных сред, содержащих: ДМАЦ 0,35 М и ОЭГ (n=5) 0,09 М при совместном введении криопротекторов. Количество тромбоцитов после размораживания – 84,9, показатели ретракции – 79,0, агрегации – 59,9, РГШ – 44,1%; ДМАЦ 0,35 М и ОЭГ (n=5) 0,09 М при последовательном введении криопротекторов. Количество кровяных пластинок – 94,5, показатели ретракции – 60,0, агрегации – 57,9 и РГШ – 51,0%; ДМАЦ 0,35 М и глицерин 0,35 М при совместном добавлении растворов криопротекторов. Количество тромбоцитов после размораживания 81,1, показатели ретракции 58,0, агрегации – 50,4, РГШ – 42,8%; ДМАЦ 0,35 М и глицерин 0,35 М при последовательном введении криопротекторов. Количество тромбоцитов – 85,4, показатели ретракции – 83,0, агрегации – 60,2, РГШ – 54,8%; ДМАЦ 0,35 М и 1,2-ПД 0,35 М при совместном добавлении криозащитных растворов. Количественная сохранность тромбоцитов 86,0, ретракция не наблюдалась, степень агрегации – 50,5, РГШ – 60,0%. Целесообразно дальнейшее исследование криозащитных сред на основе комбинаций криопротекторов, относящихся к разным классам химических соединений.

combined (59.9%) and subsequent addition of cryoprotectants (57.8%), as well as DMAC and 1,2-PD (50.6%). No statistically significant differences between aggregation extent indices of platelets, frozen with using the mentioned above media and ways of their introductions, were revealed. The ability of blood platelets for aggregation during collagen inducer introduction after cryopreservation under protection of media, containing 1,2-PD and glycerol or 1,2-PD and OEG (n=5) was absent.

Conclusions

Under platelet freezing there was established a manifested cryoprotective effect of polycomponent media, containing: 0.35 M DMAC and 0.09 M OEG (n=5) under combined cryoprotectant introduction. Platelet number after freeze-thawing was 84.9, retraction index was 79.0, 59.9 for aggregation and 44.1% for RHS; 0.35 M DMAC and 0.09 M OEG (n=5) under subsequent cryoprotectant introduction. Platelet number was 94.5, retraction indices were 60.0, 57.9 for aggregation and 51.0% for RHS; 0.35 M DMAC and 0.35 M glycerol under combined introduction of cryoprotective solutions. Platelet number after freeze-thawing was 81.1, retraction index was 58.0, 50.4 for aggregation and 42.8% for HRS; 0.35 M DMAC and 0.35 M glycerol under subsequent cryoprotectant introduction. Platelet number was 85.4, retraction indices were 83.0, 60.2 for aggregation and 54.8% for RHS; 0.35 M DMAC and 0.35 M 1,2-PG under combined addition of cryoprotective solutions. Quantitative preservation of platelet was 86.0, no retraction observed, 50.5 for aggregation extent and 60.0 % for RHS.

Further study of cryoprotective media based on combination of cryoprotectants, referred to different classes of chemical compounds, is expedient.

References

1. *Agranenko V.A., Kompaniets A.M., Balezina L.V. et al.* Isolation of platelet concentrates from donor blood LTL and their preservation // *Gematologiya i Transfuziologiya.* – 1991. – N3. – P. 29–32.
2. *Ronin V.S.* Way for platelet staining to calculate in counting chamber // *Lab. Belo.* – 1983. – N1. – P. 61–62.
3. *Skopina S.B., Vinograd-Finkel F.R., Polushina T.V., Suzdaleva V.V.* Search for efficient methods of restricting solutions for cryoprotectants for platelet cryopreservation // *Problemy Gematologii i Perelivaniya Krovi.* – 1975. – N9. – P. 17–21.
4. *Pat. N 15014 Ukraine IPC⁸ A0N 1/02.* Way for cryoprotectant removal from platelet suspension / V.I. Grischenko, A.M. Kompaniets, O.V. Knysh. Applied 18.11.2005; Published 15.06.06. – Bull. N6.
5. *Arnaud F.G., Pegg D.E.* Cryopreservation of human platelets with propane-1,2-diol // *Cryobiology.* – 1990. – Vol. 27, N2. – P. 130–136.

Accepted in 13.05.08

Литература

1. *Аграненко В.А., Компаниец А.М., Балезина Л.В. и др.* Выделение концентратов тромбоцитов из ЛТС донорской крови и их консервирование // Гематология и трансфузиология.– 1991.– №3.– С. 29–32.
2. *Ронин В.С.* Способ окраски тромбоцитов для подсчета в счетной камере // Лаб. дело.– 1983.– №1.– С. 61–62.
3. *Скопина С.Б., Виноград-Финкель Ф.Р., Полушина Т.В., Суздалева В.В.* Изыскание эффективных методов ображдающих растворов для криопротекторов для криоконсервирования тромбоцитов// Пробл. гематологии и переливания крови.– 1975.– №9.– С. 17–21.
4. *Пат. № 15014 Україна. МПК⁸ А01Н 1/02.* Спосіб видалення криопротектора із суспензії тромбоцитів / В.І. Грищенко, А.М. Компанієць, О.В. Книш. Заявлено 18.11.2005; Опубл. 15.06.06.– Бюл. № 6.
5. *Arnaud F.G., Pegg D.E.* Cryopreservation of human platelets with propane-1,2-diol // Cryobiology.– 1990.– Vol. 27, N2.– P. 130–136.

Поступила 13.05.2008