

RESEARCH IN COMPARATIVE ASPECT OF CRYOPROTECTIVE ACTION OF GLYCERIN-BASED CRYOPRESERVATIVES IN COMBINATION WITH POLYVINYL ALCOHOL OF DIFFERENT MOLECULAR WEIGHTS AT FAST AND SLOW COOLING OF HUMAN DONOR BLOOD**Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv, Ukraine)**

yana.hvozdiuk@gmail.com

The creation of new more effective methods of long-term storage of cellular components of blood today is one of the current directions of development of modern cryobiology, medicine, and transfusiology.

Existing modern technologies of cryopreservation of human erythrocytes at low and ultralow temperatures are mainly based on cryoprotective media, the main component of which is cryoprotectant glycerin in high concentrations. The disadvantage of cryopreservation of blood cells with glycerol is the need for a multi-stage process of deglycerinization of cells after thawing, before immediate clinical use, which causes additional costs and damage and complicates the process of cryopreservation of human donor blood. This significantly limits the practical use of glycerin as a cryoprotective substance. In recent years, special equipment has been developed to automate glycerol and deglycerinization of erythrocytes, but it is expensive and requires unique systems and large volumes of solutions for washing.

One of the areas of research on cryopreservation of blood cells is the use of cryoprotectants of extracellular action, which do not require removal before transfusion. However, these cryopreservation methods have not found practical clinical application due to the low osmotic stability of thawed cells and, as a consequence, the risk of developing intravascular hemolysis.

The search for multicomponent cryoprotective solutions for freezing various biological objects is actively developing. In the last five years, despite the many cryopreservatives already developed, interest in multicomponent environments is growing with renewed vigor. Some time ago, it was considered most appropriate to combine penetrating and non-penetrating cryoprotectants, and various biologically active components in the cryopreservative. This approach aimed to eliminate the root cause of damage to biological objects during cooling, that is, to inhibit the growth of extracellular and intracellular ice crystals during cooling. Secondly, stabilization of cell membranes at the stages of cryopreservation.

Key words: erythrocytes, cryopreservation, recrystallization, polyvinyl alcohol, glycerin.

Relationship of the publication with planned research works. The study was performed within the research work of the Cryoprotectants Laboratory, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine «Study of polyvinyl alcohol properties as a recrystallization inhibitor in cryoprotective media based on endo- and extracellular cryoprotectants» (№ state registration 0116 0116).

Introduction. The formation and growth of ice crystals both in the biological cell and outside create a severe problem in developing methods and technologies for cryopreservation of biological objects for further use (regenerative and transplant medicine, transfusiology, etc.) [1, 2]. Therefore, for several years the problem of finding and using a compound that can impact ice formation, especially – in the recrystallization process, is currently being actively studied in scientific institutions worldwide [3, 4, 5].

One of the critical causes of cell death is the recrystallization of ice at the stage of heating [6, 7, 8]. Inhibition of recrystallization activity is a desirable effect that can significantly improve the safety of cryopreserved material [9, 10]. Today the main problem is the development of effective cryoprotectants. These new cryopreservatives will have an enhanced effect on the inhibition of ice recrystallization, which will improve the cryopres-

ervation of not only cells but also human tissues and organs [11].

It is known that inhibition of ice recrystallization, that is reduction of already formed ice crystals, is one of the three main effects of natural antifreeze proteins, along with the ability to adsorb ice crystals on the surface and modify their growth and shape [12, 13]. Since the discovery of antifreeze proteins in the blood serum of Antarctic fish [14], they have attracted the attention of scientists as essential applications, in particular, in the cryopreservation of biological material [15]. However, there are several essential obstacles that researchers have encountered in the practice of cryopreservation: the minimal number of compounds that can be obtained from natural resources, the complexity or impossibility of complete chemical synthesis of analogs [16, 17, 18]; contradictory data on the effectiveness of using these compounds in cryopreservation of biomaterial [19]; cytotoxicity and immunogenicity of natural antifreeze proteins. Due to these obstacles, in recent years, researchers have turned their attention to synthetic compounds, which, like natural ones, have specific antirecrystallization activity without side effects [20, 21].

The solution to this problem is the development of cryopreservatives, which, along with traditional cryoprotectants, will use synthetic antifreeze compounds

characterized by specific antirecrystallization activity [22, 23 24]. From the list of these compounds, the attention of researchers is focused on a synthetic polymer – polyvinyl alcohol (PVA) [25, 26, 27]. Previous studies have shown the properties of PVA as an active inhibitor of ice recrystallization, the ability to increase the efficiency of freezing of some cells, in particular – sheep and human erythrocytes, mesenchymal cells and sperm [28]. However, it should be noted that the mechanisms of antirecrystallization activity of PVA have not been yet determined and the elucidation of the identified biological (antirecrystallization) effect in cryopreservation of biological material (sheep erythrocytes, humans) is devoted to few works [29]. But all these results are only preliminary and require more detailed research. The solution to this problem is the development of cryopreservatives, which, along with traditional cryoprotectants, will use synthetic antifreeze compounds characterized by specific antirecrystallization activity [22, 23 24]. From the list of these compounds, the attention of researchers is focused on a synthetic polymer – polyvinyl alcohol (PVA) [25, 26, 27]. Previous studies have shown the properties of PVA as an active inhibitor of ice recrystallization, the ability to increase the efficiency of freezing of some cells, in particular – sheep and human erythrocytes, mesenchymal cells and sperm [28]. However, it should be noted that the mechanisms of antirecrystallization activity of PVA have not been yet determined and the elucidation of the identified biological (antirecrystallization) effect in cryopreservation of biological material (sheep erythrocytes, humans) is devoted to few works [29]. But all these results are only preliminary and require more detailed research.

The aim of the study. Investigate the properties of polyvinyl alcohol of different molecular weights as an active inhibitor of ice recrystallization and the level of preservation of erythrocytes in the process of slow and rapid freezing-heating in cryoprotective media based on standard cryoprotection glycerol of different concentrations.

Object and methods of research. The material of the study was erythroconcentrate obtained from donor human blood type A (II), prepared on hemoconservative «Glugicir» in Kharkiv Regional Blood Service Center, which was stored for no more than 48 hours at a temperature of $(44\pm 2)^\circ\text{C}$. Erythroconcentrate was obtained by centrifugation of conserved donor blood at 1250 g for 25 minutes. Polyvinyl alcohol (PVA) (molecular weight 9 and 31 kDa), (Sigma-Aldrich, USA), and glycerol (Alchem, Ukraine) were used as cryopreservation media. For experimental studies, cryoprotective media were prepared by weight based on 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.7) and expressed as a weight percentage (%). All solutions were used after 24 hours at a temperature of $(20\pm 2)^\circ\text{C}$.

The obtained data were calculated according to the following indicators: the concentration of free hemo-

globin in the supernatant and total hemoglobin of the cell suspension was determined by the hemoglobin cyanide method using the set «Hemoglobin Spl 200» (Ukraine) and spectrophotometer KFK-3-01. «ZOMP» (Russia) 545 nm., hematocrit – determined by centrifugation SM-70, the percentage of hemolysis of erythrocytes in the supernatant was calculated by the formula given in this article [30].

We used different compositions for the study in the comparative aspect of the influence of multicomponent cryoprotective media on the preservation of erythrocytes after cryopreservation.

We used different compositions for the study in the comparative aspect of the influence of multicomponent cryoprotective media on the preservation of erythrocytes after cryopreservation.

Samples were frozen in cryoampoules «Nunc» (1,8 ml) by immersion in liquid nitrogen (-196°C), stored at -196°C for 1–3 weeks. Other samples were frozen in the software freezer «UOP-6» at an average speed cooled $3^\circ\text{C}/\text{min}$. The samples were heated in a water bath at a temperature of $40 \pm 42^\circ\text{C}$ with constant shaking of the containers.

Erythrocytes frozen in glycerol-based solutions after thawing were washed from cryoprotectant solutions by double serial centrifugation using standard saline solutions.

Statistical processing of the results was performed using the Mann-Whitney test for small samples using the software package «Statistica».

Research results and their discussion. Cryoprotective media of the following composition were studied:

20 % glycerin + 0,1 % PVA,
20 % glycerin + 0,5 % PVA,
30 % glycerin + 0,1 % PVA,
30 % glycerin + 0,5 % PVA,
40 % glycerin + 0,1 % PVA,
40 % glycerin + 0,5 % PVA molecular weight 9 and 31 kDa.

As a control were 20 %, 30 % and 40 % solutions of glycerol and 0,1 % and 0,5 % PVA with molecular weight 9 and 31 kDa.

Research results and their discussion. Determination of the preservation of human erythrocytes after cooling by immersion in liquid nitrogen (-196°C) under the protection of PVA solutions with a molecular mass of 9 kDa (concentration of 0,2 % and 1 %) and subsequent thawing in a water bath ($40-42^\circ\text{C}$) showed that when using the rapid method of cooling erythrocytes, they completely hemolyze (**table 1**).

After freezing-thawing of erythrocytes in 20 %, 30 % and 40 % solutions of glycerol (control), the highest level of preservation of erythrocytes in terms of hemolysis was obtained with 40 % solutions of glycerol.

Analysis of the results of erythrocytes freezing in combined media showed the dependence of the level of erythrocytes preservation on their composition: the concentration of glycerol and PVA, the molecular weight of polyvinyl alcohol.

Table 1 – Preservation of erythrocytes in glycerol solutions in combination with PVA after fast freezing (immersion in nitrogen)

Media	Hemolysis,%	Hematocrit,%
0,1 % PVA molecular masses 9 kDa	Complete hemolysis	-
0,5 % PVA molecular masses 9 kDa	Complete hemolysis	-
Glycerin + PVA 9 kDa		
20 % glycerin	10,7	15
20 % glycerin + 0,1 % PVA	8,2	29
20 % glycerin + 0,5 % PVA	2,75	15
30 % glycerin	11,2	27
30 % glycerin + 0,1 % PVA	32	12
30 % glycerin + 0,5 % PVA	28	-
40 % glycerin	4,3	28
40 % glycerin + 0,1 % PVA	Hemolysis	7
40 % glycerin + 0,5 % PVA	4,42	25
Glycerin + PVA molecular masses 31 kDa		
20 % glycerin + 0,1 % PVA	70	17
20 % glycerin + 0,5 % PVA	2,75	15
30 % glycerin + 0,1 % PVA	29	18
30 % glycerin + 0,5 % PVA	2,9	20

Thus, introducing 0,1 % and 0,5 % PVA molecular masses 9 kDa to 20 % glycerol solution helped increase the safety of cells after freezing. The combination of 30 % glycerol solution with 0,1 % and 0,5 % PVA molecular masses 9 kDa led to an increase in the number of hemolyzed cells and deterioration of freezing results.

The combination of 20 % and 30 % glycerol solutions with 0,5 % PVA with molecular mass 31 kDa also contributed to a significant increase in the level of preservation of erythrocytes compared to cryoprotectant solutions.

The highest rates of preservation of erythrocytes were obtained in the following combined solutions:

- 20 % glycerin + 0,1 % PVA 9 kDa;
- 20 % glycerin + 0,5 % PVA 9 kDa;
- 40 % glycerin + PVA 0,5 % 9 kDa;
- 20 % glycerin + 0,5 % PVA 31 kDa;
- 30 % glycerin + 0,5 % PVA 31 kDa.

Thus, there is a tendency to increase the safety of erythrocytes after freezing-reheating combined with PVA media compared to individual glycerol solutions.

The obtained results give grounds to predict the prospects of developing multicomponent media based on a combination of glycerol with PVA molecular masses 9 kDa and 31 kDa for freezing human erythrocytes.

At the next stage, experiments were performed to freeze human erythrocytes at a 3 °C/min rate in combined solutions containing glycerin (20 %, 30 % and 40 %) in combination with PVA molecular masses 9 kDa and 31 kDa (0,2 % and 1 %).

It was found that freezing erythrocytes at a rate of 3 °C/min in combined solutions containing 20 %, 30 %, and 40 % glycerol in combination with 0,1 % and 0,5 % PVA leads to almost complete death of erythrocytes after thawing (**table 2**). During cell freezing in 30 % glycerol solution with 0,5 % PVA we got up to 20 % of the preserved cells.

Table 2 – Preservation of erythrocytes in glycerol solutions in combination with PVA after slow freezing (3°C/min)

Media	Hemolysis,%	Hematocrit,%
Control	0,01±0,01	40,0±2,1
0.1 % PVA	hemolysis	
0,5 % PVA	85	21
20 % glycerin	hemolysis	
20 % glycerin + 0,1 % PVA	hemolysis	
20 % glycerin + 0,5 % PVA	hemolysis	
30 % glycerin + 0,1 % PVA	hemolysis	
30 % glycerin + 0,5 % PVA	74	25
20 % glycerin + 0,1 % PVA	hemolysis	
30 % glycerin + 0,1 % PVA	hemolysis	
40 % glycerin + 0,1 % PVA	hemolysis	

Thus, the use of low freezing rates for cryoprotective solutions containing 20–40 % of the glycerol concentration is unacceptable.

Conclusions. As a result of a comparative study of cryoprotective media of different cryoprotectants with solutions of polyvinyl alcohol in the rapid method of freezing blood cells in particular (erythrocytes) by immersing the samples in liquid nitrogen. It was found that after freezing-reheating erythrocytes in multicomponent solutions based on glycerol in combination with PVA with molecular mass 9 kDa and 31 kDa, there is a tendency to increase the preservation of erythrocytes by hemolysis compared with the action of 20 %, 30 % and 40 % glycerol mono solutions.

Prospects for further research. The research results are the basis for further research aimed at the development and detailed study of multicomponent media based on combinations of different cryoprotective compounds with polyvinyl alcohol for freezing cell suspensions.

References

1. Pegg DE. Principles of Cryopreservation. *Methods Molecular Biology*. 2015;1257:3–19. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-219-5-1>.
2. Valeri CR, Ragno G. The effect of storage of fresh frozen plasma at -80 C for as long as 14 years on plasma clotting proteins. *Transfusion*. 2005;45:1829–1830. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2005.00614>.
3. Fuller BJ. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo Letters*. 2004;25(6):375–388.
4. Sputteck A, Kuehnl P, Rowe AW. Cryopreservation of erythrocytes, thrombocytes and lymphocytes. *Transfus. Med. Hemother.* 2007;34(4):262–267.
5. Naabel AHT, Yubyeol J, Il-Jeoung Y. Use polyvinyl alcohol as a chemically defined compound in egg yolk-free extender for dog sperm cryopreservation. *Reprod Domest Anim*. 2019;54(11):1459–1458. DOI: <https://doi.org/10.1111/rda.13547>.
6. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am.J. Physiol.* 1984;247:125–142. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125>

7. Fowler A, Toner M. Cryo-injury and biopreservation. *Ann. NY Acad. Sci.* 2005;1066:119–135. DOI: <https://doi.org/10.1196/annals.1363.010>.
8. Jin B, Kusanagi K, Ueda M. Formation of extracellular and intracellular ice during warming of vitrified mouse morulae and its effect on embryo survival. *Cryobiology*. 2008;56:233–240. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.03.004>
9. Congton T, Notman R, Gibson M. Antifreeze (glyco)protein mimetic behavior of poly(vinyl alcohol): detailed structure ice recrystallization inhibition activity study. *Biomacromolecules*. 2013;14(5):1578–1586. DOI: <https://doi.org/10.1021/bm400217j>.
10. Beloy AM, Hryshchenko VY. *Kryobyolohyia*. Kyev: Naukova dumka; 1994. 431 s. [in Ukrainian].
11. Muraoka M, Ohtake M, Yamamoto Y. Kinetic inhibition effect of Type I and III antifreeze proteins on unidirectional tetrahydrofuran hydrate crystal growth. *RSC Advances*. 2019;9(20):1530–1537.
12. Kristiansen E, Zachariassen KE. The mechanism by which fish antifreeze proteins cause thermal hysteresis. *Cryobiology*. 2005;51(3):262–280. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.07.007>
13. Pertaya N, Marshall BCh, Celik Y. Direct visualization of spruce budworm antifreeze protein interacting with ice crystals: basal plane affinity confers hyperactivity. *Biophys J*. 2008;95(1):333–341. DOI: <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.125328>
14. De Vries AL, Wohlschlag DE. Freezing resistance in some Antarctic fishes. *Science*. 1969;163(3871):1073–1075. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.163.3871.1073>.
15. Carpenter JF, Hansen TN. Antifreeze protein modulates cell survival during cryopreservation: mediation through influence on ice crystal growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89:8953–8957. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.89.19.8953>.
16. Tachibana Y, Fletcher GL, Fujitani N. Antifreeze glycoproteins: elucidation of the structural motifs that are essential for antifreeze activity. *Angew. Chem., Int Ed*. 2004;43:856–862. DOI: <https://doi.org/10.1002/ange.200353110>
17. Peltier R, Brimble MA, Wojnar J M. Synthesis and antifreeze activity of fish antifreeze glycoproteins and their analogues. *Chem. Sci*. 2010;1:538–551.
18. Wilkinson BL, Stone RS, Capicciotti CJ. Total Synthesis of Homogeneous Antifreeze Glycopeptides and Glycoproteins. *Angew. Chem., Int. Ed*. 2012;1:3606–3610. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2368-z>.
19. Koshimoto C, Mazur P. Effect of warming rate, temperature and antifreeze proteins on the survival of mouse spermatozoa frozen at an optimal rate. *Cryobiology*. 2002;45:49–59. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0011-2240\(02\)00105-0](https://doi.org/10.1016/s0011-2240(02)00105-0).
20. Gibson MJ, Barker CA, Spains SG. Inhibition of crystal growth by synthetic glycopolymers: implication for the rational design of antifreeze glycoprotein mimics. *Biomacromolecules*. 2009;10:328–333. DOI: <https://doi.org/10.1021/bm801069x>.
21. Matsumura K, Hyon SH. Polyampholytes as low toxic efficient cryoprotective agents with antifreeze protein properties. *Biomaterials*. 2009;3:4842–4849. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.05.025>.
22. Congdon T, Notman R, Gibson M. Antifreeze (glyco) protein mimetic behavior of poly (vinyl alcohol): detailed structure ice recrystallization inhibition activity study. *Biomacromolecules*. 2013;14:1578–1586. DOI: <https://doi.org/10.1021/bm400217j>
23. Weng L, Swee A, Toner M. Role synthetic antifreeze agents in catalyzing ice nucleation. *Cryobiology*. 2018;84:91–94. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.08.010>.
24. Bercea M, Morariu S, Rusu D. In situ gelation of aqueous solutions of entangled poly(vinylalcohol). *Soft Matter*. 2013;9:1244–1253.
25. Hvozdiuk YaV, Chekanova VV, Pakhomova YuS, Kompaniyets AM. Fyzyko-khimichni vlastyosti ta kriozakhysna diya rozhyvnyv polivinilovoho spyrtu, hlitserynu ta seredovyshch na osnovi yikh kombinatsiy pry zamorozhuvanni erytrotsytyv. *Problemy kriobiolohiyi i kriomedytyny*. 2020;30(3):288. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo30.03a.288>. [in Ukrainian].
26. Hvozdiuk YaV, Pakhomova YuS, Chekanova VV, Kompaniyets AM. Kriozakhysna diya kriokonservantiv na osnovi 1,2-PD ta polivinilovoho spyrtu (m. m. 9 kDa) pry povil'nomy okholodzhenni erytrotsytyv lyudyny. *Scientific collection «Interconf»*. 2021;48:783–785. [in Ukrainian].
27. Hvozdiuk YaV, Dyubko TS, Kompaniyets AM. Vplyv zamorozhuvanya-vidihrivu pid zakhystom polivinilovoho spyrtu (m. m. 9 kDa) na bilky erytrotsytyv. *Scientific collection «Interconf»*. 2021;65:128–132. [in Ukrainian].
28. Liu S, Wang W, von Moos E. In vitro studies of antifreeze glycoprotein (AFGP) and a C-linked AFGP analogue. *Biomacromolecules*. 2007;8:1456–1462. DOI: <https://doi.org/10.1021/bm061044o>.
29. Gibson MJ. Slowing the growth of ice with synthetic macromolecules beyond antifreeze (glyco)proteins. *Polym. Chem*. 2010;1:1141–1152.
30. Huggins CE. Prevention of hemolysis volumes of red blood cells slowly frozen and thawed in the presence of dimethylsulfoxide. *Transfusion*. 1963;31:483–493.

ДОСЛІДЖЕННЯ У ПОРІВНЯЛЬНОМУ АСПЕКТІ КРІОЗАХИСНОЇ ДІЇ КРІОКОНСЕРВАНТІВ НА ОСНОВІ ГЛІЦЕРИНУ В КОМБІНАЦІЇ З ПОЛІВІНІЛОВИМ СПИРТОМ РІЗНИХ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАС ПРИ ШВИДКОМУ ТА ПОВІЛЬНОМУ ОХОЛОДЖЕННІ ДОНОРСЬКОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ

Гвоздюк Я.В. Компанієць А.М.

Резюме. Формування та зростання кристалів льоду як в біологічній клітині так і поза її межами створює серйозну проблему при розробці способів і технологій криоконсервування біологічних об'єктів для подальшого використання. Тому протягом декількох років проблема з пошуку та використання сполуки, здатної створювати вплив на процеси льодоутворення, особливо – на процес рекристалізації, наразі активно досліджуються в наукових закладах різних країн світу.

Однією з важливих причин загибелі клітин є рекристалізація льоду на етапі відігріву. Пригнічення рекристалізаційної активності є бажаним ефектом який може значно покращити збереженість криоконсервованого матеріалу.

На сьогоднішній день головною проблемою є розробка ефективних засобів криозахисту, нових криоконсервантів які матимуть посилену дію на процеси пригнічення рекристалізації льоду, що в свою чергу буде сприяти покращенню криозбереженості не тільки клітин а й тканин і органів людини.

Проте існує низка важливих перешкод з якими дослідники стикнулися в практиці криоконсервування: це дуже мала кількість сполук, які можна отримати з природних ресурсів, складність або неможливість повного хімічного синтезу аналогів; суперечливі данні щодо ефективності використання цих сполук при криоконсервуванні біомате-

ріалу; цитотоксичність та імуногенність природних антифризних білків. У зв'язку з цими перешкодами в останні роки дослідники звертають свою увагу на синтетичні сполуки, яким теж подібно природним притаманна специфічна антирекристалізаційна активність без побічних ефектів.

Вирішенням поставленої задачі є розробка кріоконсервантів, в яких поряд з традиційними кріопротекторами будуть використовуватися синтетичні сполуки-антифризи, яким притаманна специфічна антирекристалізаційна активність. З переліку цих сполук увага дослідників прикута до синтетичного полімеру – полівініловий спирт (ПВС).

Метою нашого дослідження було дослідити властивості ПВС різних молекулярних мас як активного інгібітора рекристалізації льоду та рівень збереженості еритроцитів в процесі повільного та швидкого заморожування-відігріву в кріозахисних середовищах на основі стандартного кріопротектора гліцерину різних концентрацій.

Об'єкт і методи дослідження. Об'єктом дослідження був еритроконцентрат, отриманий з донорської крові людини групи А(II), заготовленої на гемоконсерванті «Глюгіцир». Еритроконцентрат отримували центрифугуванням консервованої донорської крові при 1250 g протягом 25 хв. Отриманні данні розраховували за наступними показниками: концентрація вільного гемоглобіну в надосадовій рідині та загального гемоглобіну клітинної суспензії, визначали гемоглобінціанідним методом за допомогою набору «Гемоглобін Спл 200» (Україна) та спектрофотометру КФК-3-01 «ЗОМЗ» (Росія) довжина хвилі 540–545 нм., показник гематокриту – визначали на центрифугі СМ-70, процент гемолізу еритроцитів в надосаді розраховували за формулою наведеною в роботі Huggins CE. (Prevention of hemolysis of large volumes of red blood cells slowly frozen and thawed in the presence of dimethylsulfoxide).

Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію Манна-Уїтні для малих вибірок з використанням програмного пакету «Statistica».

Результати. В результаті проведеного порівняльного дослідження кріозахисних середовищ різного складу кріопротекторів з розчинами полівінілового спирту при швидкому методі заморожування клітин крові зокрема (еритроцитів) шляхом занурення зразків до рідкого азоту. Встановлено, що після заморожування-відігріву еритроцитів у багатокомпонентних розчинах на основі гліцерину в комбінації з ПВС м. м. 9 і 31 кДа спостерігається тенденція до підвищення збереженості еритроцитів за результатами гемолізу у порівнянні з дією 20 %, 30 % і 40 %-х монорозчинів гліцерину.

Ключові слова: еритроцити, кріоконсервація, рекристалізація, полівініловий спирт, гліцерин.

RESEARCH IN COMPARATIVE ASPECT OF CRYOPROTECTIVE ACTION OF GLYCERIN-BASED CRYOPRESERVATIVES IN COMBINATION WITH POLIVINYL ALCOHOL OF DIFFERENT MOLECULAR WEIGHTS AT FAST AND SLOW COOLING OF HUMAN DONOR BLOOD

Hvozdiuk Y.V., Kompaniets A.M.

Abstract. The formation and growth of ice crystals both inside and outside the biological cell pose a serious problem in the development of methods and technologies for cryopreservation of biological objects for further use. Therefore, for several years the problem of finding and using a compound that can influence the processes of ice formation, especially the recrystallization process, is currently being actively studied in scientific institutions around the world.

One of the important causes of cell death is the recrystallization of ice at the thawing stage. Inhibition of recrystallization activity is a desirable effect that can significantly improve the safety of cryopreserved material.

Today the main problem is the development of effective means of cryoprotection, new cryoprotectants that will have an enhanced effect on the inhibition of ice recrystallization, which in turn will improve the cryopreservation of not only cells but also human tissues and organs.

However, there are a number of important obstacles that researchers have encountered in the practice of cryopreservation: the very small number of compounds that can be obtained from natural resources, the complexity or impossibility of complete chemical synthesis of analogues; contradictory data on the effectiveness of the use of these compounds in cryopreservation of biomaterial; cytotoxicity and immunogenicity of natural antifreeze proteins. In connection with these obstacles, in recent years, researchers have turned their attention to synthetic compounds, which are also similar to natural specific antirecrystallization activity without side effects.

The solution to this problem is the development of cryoprotectants, which, along with traditional cryoprotectants will use synthetic compounds – antifreeze, which has a specific antirecrystallization activity. From the list of these compounds, the attention of researchers is focused on a synthetic polymer – polyvinyl alcohol (PVA).

The aim of our study was to investigate the properties of PVA of different molecular weights as an active inhibitor of ice recrystallization and the level of preservation of erythrocytes in the process of slow and rapid freezing – heating in cryoprotective media based on standard cryoprotectant glycerin of different concentrations.

Materials and methods. The material of the study was erythroconcentrate obtained from human donor blood group A (II), prepared on the hemopreservative «Glugetsir». Erythroconcentrate was obtained by centrifugation of canned donor blood at 1250 g for 25 minutes. The obtained data were calculated according to the following indicators: the concentration of free hemoglobin in the supernatant and total hemoglobin of cell suspensions, determined by hemoglobin cyanide method using the kit «Hemoglobin SPL 200» (Ukraine) and spectrophotometer KFK – wave – 3-01 «ZOMZ», 540–545 nm, hematocrit was determined on a centrifuge «SM-70», the rate of hemolysis of erythrocytes in the supernatant was calculated by the formula given in Huggins CE. (Prevention of hemolysis of large volumes of red blood cells slowly frozen and thawed in the presence of dimethylsulfoxide).

Statistical processing of the results was performed using the Mann-Whitney test for small samples using the software package «Statistics».

Analysis of results. As a result of a comparative study of cryoprotective media of different composition of cryoprotectants with solutions of polyvinyl alcohol in the rapid method of freezing blood cells in particular (erythrocytes) by immersing the samples in liquid nitrogen. It was found that after freezing-heating of erythrocytes in multicomponent solutions based on glycerol in combination with PVA m. m. 9 and 31 kDa, there is a tendency to increase the preservation of erythrocytes by hemolysis in comparison with the action of 20 %, 30 %, 40 % glycerol mono solutions.

Key words: erythrocytes, cryopreservation, recrystallization, polyvinyl alcohol.

ORCID and contributionship:

Hvozdiuk Y.V.: 0000-0001-9377-4678^{BCDEF}

Kompaniets A.M.: 0000-0002-0633-7937^{ABE}

Conflict of interest:

The Authors declare no conflict of interest.

Corresponding author

Hvozdiuk Yana Vasylivna

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

Ukraine, 6101523, Kharkov, 23 Pereyaslavskaya str.

Tel.: +380573734143

E-mail: yana.hvozdiuk@gmail.com

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article

Received 15.11.2021

Accepted 01.05.2022

DOI 10.29254/2077-4214-2022-2-1-164-89-99

УДК 641.528+661.188.1+678.746+547.42+612.111

Гвоздюк Я.В. Компанієць А.М.

ДОСЛІДЖЕННЯ У ПОРІВНЯЛЬНОМУ АСПЕКТІ КРІОЗАХИСНОЇ ДІЇ КРІОКОНСЕРВАНТІВ НА ОСНОВІ ГЛІЦЕРИНУ В КОМБІНАЦІЇ З ПОЛІВІНІЛОВИМ СПИРТОМ РІЗНИХ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАС ПРИ ШВИДКОМУ ТА ПОВІЛЬНОМУ ОХОЛОДЖЕНІ ДОНОРСЬКОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ

Інститут Проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків, Україна)

yana.hvozdiuk@gmail.com

Створення нових більш ефективних методів довгострокового зберігання клітинних компонентів крові є одним з актуальних напрямків розвитку сучасної кріобіології, медицини і трансфузіології на сьогоднішній день.

Існуючі у світі сучасні технології кріоконсервування еритроцитів людини при низьких та ультранизких температурах в основному базуються на застосуванні кріозахисних середовищ, головним компонентом яких є кріопротектор гліцерин у великих концентраціях. Недоліком кріоконсервації клітин крові з гліцерином є необхідність багатоступового процесу дегліцеринізації клітин після розморожування, перед безпосереднім клінічним застосуванням, що в свою чергу спричиняє додаткові витрати та пошкодження, ускладнює технологічний процес кріоконсервування донорської крові людини. Це суттєво обмежує практичне використання гліцерину як кріопротекторну речовину. В останні роки було розроблено спеціальну апаратуру для автоматизації гліцеринізації та дегліцеринізації еритроцитів, проте вона також є витратною, потребує спеціальних систем і великих об'ємів розчинів для відмивання.

Одним з напрямків наукових досліджень кріоконсервування клітин крові є використання кріопротекторів екзоцелюлярної дії, які не потребують видалення перед трансфузією. Проте ці методи кріоконсервування не знайшли практичного клінічного застосування у зв'язку з низькою осмотичною стійкістю розморожених клітин і, як наслідок – небезпекою розвитку внутрішньо-судинного гемолізу.

Пошук багатокомпонентних кріозахисних розчинів для заморожування різних біологічних об'єктів активно розвивається. В останні п'ять років, незважаючи на велику кількість вже розроблених кріоконсервантів, інтерес до багатокомпонентних середовищ породжується з новою силою. Деякий час тому найбільш доцільним вважалося

об'єднувати у кріоконсерванті проникаючі та непроникаючі кріопротектори, різні біологічно активні компоненти. Ціллю такого підходу було, по – перше, усунення основної причини пошкодження біооб'єктів в процесі охолодження, тобто інгібування росту поза – та внутрішньо клітинних кристалів льоду при охолодженні. По – друге стабілізація мембран клітин на етапах кріоконсервування.

Ключові слова: еритроцити, кріоконсервація, рекристалізація, полівініловий спирт, гліцерин.

Зв'язок роботи з плановими науково-дослідними роботами. Дослідження виконано у рамках науково-дослідної роботи лабораторії кріопротекторів, Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України «Дослідження властивостей полівінілового спирту як інгібітора рекристалізації у кріозахисних середовищах на основі ендо- і екзоцелюлярних кріопротекторів» (№ державної реєстрації 0116U 003492).

Вступ. Формування та зростання кристалів льоду як в біологічній клітині так і поза її межами створює серйозну проблему при розробці способів і технологій кріоконсервування біологічних об'єктів для подальшого використання (регенеративна і трансплантаційна медицина, трансфузіологія, тощо) [1, 2]. Тому протягом декількох років проблема з пошуку та використання сполуки, здатної створювати вплив на процеси льодоутворення, особливо – на процес рекристалізації, наразі активно досліджуються в наукових закладах різних країн світу [3, 4, 5].

Однією з важливих причин загибелі клітин є рекристалізація льоду на етапі відігріву [6, 7, 8]. Пригнічення рекристалізаційної активності є бажаним ефектом який може значно покращити збереженість кріоконсервованого матеріалу [9, 10].

На сьогоднішній день головною проблемою є розробка ефективних засобів кріозахисту, нових кріоконсервантів які матимуть посилену дію на процеси пригнічення рекристалізації льоду, що в свою чергу буде сприяти покращенню кріозбереженості не тільки клітин а й тканин і органів людини [11].

Відомо, що пригнічення рекристалізації льоду, тобто зменшення вже сформованих кристалів льоду, є одним з трьох головних ефектів природних антифризних білків, наряду із здатністю адсорбувати на поверхні кристалів льоду, модифікувати їх ріст і форму [12, 13]. З часу відкриття антифризних протеїнів в сироватці крові антарктичних риб [14], вони привертають увагу науковців як важливі добавки, зокрема, при кріоконсервуванні біологічного матеріалу [15]. Проте існує низка важливих перешкод з якими дослідники стикнулися в практиці кріоконсервування: це дуже мала кількість сполук, які можна отримати з природних ресурсів, складність або неможливість повного хімічного синтезу аналогів [16, 17, 18]; суперечливі данні щодо ефективності використання цих сполук при кріоконсервуванні біоматеріалу [19]; цитотоксичність та імуногенність природних антифризних білків. У зв'язку з цими перешкодами в останні роки дослідники звертають свою увагу на синтетичні сполуки, яким теж подібно природним притаманна специфічна антирекристалізаційна активність без побічних ефектів [20, 21].

Вирішенням поставленої задачі є розробка кріоконсервантів, в яких поряд з традиційними кріопротекторами будуть використовуватися синтетичні сполуки-антифризи, яким притаманна специфічна антирекристалізаційна активність [22, 23, 24]. З переліку цих сполук увага дослідників прикута до синтетичного полімеру – полівініловий спирт (ПВС) [25, 26, 27]. Попередні дослідження показали властивості ПВС як активного інгібітора рекристалізації льоду, можливість підвищувати ефективність заморожування деяких клітин, зокрема – еритроцитів вівці і людини, мезенхімальних клітин і сперміїв [28]. Проте слід зазначити, що механізми антирекристалізаційної активності ПВС ще не визначені та з'ясування виявленого біологічного (антирекристалізаційного) ефекту при кріоконсервуванні біологічного матеріалу (еритроцити вівці, людини) присвячені нечисельні роботи [29]. Але всі наведені результати мають тільки попередній характер і потребують більш детального дослідження.

Мета дослідження. Дослідити властивості полівінілового спирту різних молекулярних мас як активного інгібітора рекристалізації льоду та рівень збереженості еритроцитів в процесі повільного та швидкого заморожування-відігріву в кріозахисних середовищах на основі стандартного кріопротектора гліцерину різних концентрацій.

Об'єкт і методи дослідження. Матеріалом дослідження був еритроконцентрат, отриманий з донорської крові людини групи А (II), заготовленої на гемоконсерванті «Глюгіцир» у ХОЦПК, яка зберігалась не більше 48 годин при температурі $(44 \pm 2)^\circ\text{C}$. Еритроконцентрат отримували методом центрифугування консервованої донорської крові при 1250 г протягом 25 хв.

У роботі в якості середовищ для кріоконсервування використовували полівініловий спирт (ПВС) (м. м.9 та 31 кДа), («Sigma-Aldrich», США), гліцерин (фірма «Алхім», Україна). Для експериментальних досліджень кріопротекторні середовища готували ваговим методом на основі 0,1 М фосфатно-сольового буферу (ФСБ) (рН 7,7) та виражали в масових відсотках (мас.%). Всі розчини використовувалися після 24-годинної витримки при температурі $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$.

Отриманні данні розраховували за наступними показниками: концентрація вільного гемоглобіну в надосадовій рідині та загального гемоглобіну клітинної суспензії, визначали гемоглобінціанідним методом за допомогою набору «Гемоглобін Спл 200» (Україна) та спектрофотометру КФК-3-01 «ЗОМЗ» (Росія) довжина хвилі 540–545 нм., показник гематокриту – визначали на центрифугі СМ-70,

процент гемолізу еритроцитів в надосаді розраховували за формулою наведеною в роботі [30].

Для дослідження у порівняльному аспекті впливу багатокомпонентних кріозахисних середовищ на збереженість еритроцитів після кріоконсервування було досліджено різні за складом композиції.

Зразки заморожували в кріоампулах «Nunc» (1,8 мл) шляхом занурення в рідкий азот (–196°C), зберігали при – 196°C протягом 1–3 тижнів. Інші зразки заморожували у програмному заморожувачі «УОП-6» із середньою швидкістю охолодження 3°C/хв. Зразки відігрівали на водяній бані при температурі 40±42°C при постійному похитуванні контейнерів.

Еритроцити заморожені у розчинах на основі гліцерину після розморожування відмивали від кріозахисних розчинів методом двократного серійного центрифугування за допомогою стандартних сольових розчинів.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію Манна-Уїтні для малих вибірок з використанням програмного пакету «Statistica».

Результати дослідження та їх обговорення. Були досліджені кріозахисні середовища наступного складу:

- 20 % гліцерин + 0,1 % ПВС,
- 20 % гліцерин + 0,5 % ПВС,
- 30 % гліцерин + 0,1 % ПВС,
- 30 % гліцерин + 0,5 % ПВС,
- 40 % гліцерин + 0,1 % ПВС,
- 40 % гліцерин + 0,5 % ПВС м. м. 9 кДа і 31 кДа.

В якості контролю були 20 %, 30 % і 40 % розчини гліцерину та 0,1 % і 0,5 % ПВС з м. м. 9 кДа і 31 кДа.

Результати дослідження та їх обговорення.

Визначення збереженості еритроцитів людини після охолодження шляхом занурення у рідкий азот (–196°C) під захистом розчинів ПВС з м. м. 9 кДа (концентрація 0,2 % та 1 %) і подальшого розморожування на водяній бані (40–42 °C) показали, що при використанні швидкого способу охолодження еритроцитів вони повністю гемолізують (табл. 1).

Після заморожування-відтавання еритроцитів у 20 %, 30 % і 40 %-х розчинах гліцерину (контроль) найбільш високий рівень збереженості еритроцитів за показником гемолізу отриманий з 40 % розчинами гліцерину.

Аналіз результатів заморожування еритроцитів в комбінованих середовищах показав залежність рівня збереженості еритроцитів від їх складу: концентрації гліцерину і ПВС, молекулярної маси полівінілового спирту.

Так, введення 0,1 % і 0,5 % ПВС м. м.9 кДа до 20 %-го розчину гліцерину сприяло підвищенню збереженості клітин після заморожування. Комбінація 30 % розчину гліцерину з 0,1 % і 0,5 % ПВС м. м. 9 кДа призводила до збільшення кількості гемолізованих клітин і погіршення результатів заморожування.

Таблиця 1 – Збереженість еритроцитів у розчинах гліцерину в комбінації з ПВС після швидкого заморожування (занурення в азот)

Середовище	Гемоліз,%	Гематокрит,%
0,1 % ПВС м. м. 9 кДа	Повний гемоліз	-
0,5 % ПВС м. м. 9 кДа	Повний гемоліз	-
Гліцерин + ПВС 9 кДа		
20 % гліцерин	10,7	15
20 % гліцерин + 0,1 % ПВС	8,2	29
20 % гліцерин + 0,5 % ПВС	2,75	15
30 % гліцерин	11,2	27
30 % гліцерин + 0,1 % ПВС	32	12
30 % гліцерин + 0,5 % ПВС	28	–
40 % гліцерин	4,3	28
40 % гліцерин + 0,1 % ПВС	Гемоліз	7
40 % гліцерин + 0,5 % ПВС	4,42	25
Гліцерин + ПВС м. м. 31 кДа		
20 % гліцерин + 0,1 % ПВС	70	17
20 % гліцерин + 0,5 % ПВС	2,75	15
30 % гліцерин + 0,1 % ПВС	29	18
30 % гліцерин + 0,5 % ПВС	2,9	20

Комбінація 20 % і 30 % розчинів гліцерину з 0,5 % ПВС з м. м. 31 кДа також сприяло значному підвищенню рівня збереженості еритроцитів у порівнянні з монорозчинами кріопротектору.

Найбільш високі показники збереженості еритроцитів були отримані в наступних комбінованих розчинах:

- 20 % гліцерин + 0,1 % ПВС 9 кДа;
- 20 % гліцерин + 0,5 % ПВС 9 кДа;
- 40 % гліцерин + ПВС 0,5 % 9 кДа;
- 20 % гліцерин + 0,5 % ПВС 31 кДа;
- 30 % гліцерин + 0,5 % ПВС 31 кДа.

Таким чином, визначена тенденція до підвищення збереженості еритроцитів після заморожування-відігріву у комбінованих з ПВС середовищах у порівнянні з окремим розчинами гліцерину.

Одержані результати дають підставу прогнозувати перспективність розробки багатокомпонентних середовищ на основі в комбінації гліцерину з ПВС м. м. 9 кДа і 31 кДа для заморожування еритроцитів людини.

На наступному етапі були проведені експерименти по заморожуванню еритроцитів людини зі швидкістю 3 °C/хв. у комбінованих розчинах які містять гліцерин (20 %, 30 % і 40 %) в поєднанні з ПВС м. м. 9 кДа і 31 кДа (0,2 % і 1 %).

Встановлено, що заморожування еритроцитів зі швидкістю 3°C/хв. у комбінованих розчинах які містять 20 %, 30 % і 40 % гліцерин у поєднанні 0,1 % і 0,5 % ПВС призводить до майже повної загибелі еритроцитів після розморожування (табл. 2). При заморожуванні клітин у 30 % розчині гліцерину з 0,5 % ПВС отримано до 20 % збережених клітин.

Таблиця 2 – Збереженість еритроцитів у розчинах гліцерину в комбінації з ПВС після повільного заморожування (3°C/хв)

Середовище	Гемоліз,%	Гематокрит,%
Контроль	0,01±0,01	40,0±2,1
0.1 % ПВС	гемоліз	
0,5 % ПВС	85	21
20 % гліцерин	гемоліз	
20 % гліцерин + 0,1 % ПВС	гемоліз	
20 % гліцерин + 0,5 % ПВС	гемоліз	
30 % гліцерин + 0,1 % ПВС	гемоліз	
30 % гліцерин + 0,5 % ПВС	74	25
20 % гліцерин + 0,1 % ПВС	гемоліз	
30 % гліцерин + 0,1 % ПВС	гемоліз	
40 % гліцерин + 0,1 % ПВС	гемоліз	

Таким чином використання низьких швидкостей заморожування для криозахисних розчинів, що містять 20–40 % концентрації гліцерину, є неприйнятним.

Висновки. В результаті проведеного порівняльного дослідження криозахисних середовищ різного складу криопротекторів з розчинами полівінілового спирту при швидкому методі заморожування клітин крові зокрема (еритроцитів) шляхом занурення зразків до рідкого азоту. Встановлено, що після заморожування-відігріву еритроцитів у багатокомпонентних розчинах на основі гліцерину в комбінації з ПВС з м. м. 9 і 31 кДа спостерігається тенденція до підвищення збереженості еритроцитів за результатами гемолізу у порівнянні з дією 20 %, 30 % і 40 % -х монорозчинів гліцерину.

Перспективи подальших досліджень. Результати проведених досліджень є підставою подальших досліджень, спрямованих на розробку і докладне вивчення багатокомпонентних середовищ на основі комбінацій різних криопротекторних сполук з полівініловим спиртом для заморожування клітинних суспензій.

Література

- Pegg DE. Principles of Cryopreservation. *Methods Molecular Biology*. 2015;1257:3–19. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-219-5-1>.
- Valeri CR, Ragno G. The effect of storage of fresh frozen plasma at –80 C for as long as 14 years on plasma clotting proteins. *Transfusion*. 2005;45:1829–1830. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2005.00614>.
- Fuller BJ. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo Letters*. 2004;25(6):375–388.
- Sputtek A, Kuehnl P, Rowe AW. Cryopreservation of erythrocytes, thrombocytes and lymphocytes. *Transfus. Med. Hemother*. 2007;34(4):262–267.
- Naabel AHT, Yubyeol J, Il-Jeoung Y. Use polyvinyl alcohol as a chemically defined compound in egg yolk-free extender for dog sperm cryopreservation. *Reprod Domest Anim*. 2019;54(11):1459–1458. DOI: <https://doi.org/10.1111/rda.13547>.
- Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am.J. Physiol*. 1984;247:125–142. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.3.C.125>
- Fowler A, Toner M. Cryo-injury and biopreservation. *Ann. NY Acad. Sci*. 2005;1066:119–135. DOI: <https://doi.org/10.1196/annals.1363.010>.
- Jin B, Kusanagi K, Ueda M. Formation of extracellular and intracellular ice during warming of vitrified mouse morulae and its effect on embryo survival. *Cryobiology*. 2008;56:233–240. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.03.004>
- Congton T, Notman R, Gibson M. Antifreeze (glyco)protein mimetic behavior of poly(vinyl alcohol): detailed structure ice recrystallization inhibition activity study. *Biomacromolecules*. 2013;14(5):1578–1586. DOI: <https://doi.org/10.1021/bm400217j>.
- Beloys AM, Hryshchenko VY. *Kryobylohyha*. Kyev: Naukova dumka; 1994. 431 s. [in Ukrainian].
- Muraoka M, Ohtake M, Yamamoto Y. Kinetic inhibition effect of Type I and III antifreeze proteins on unidirectional tetrahydrofuran hydrate crystal growth. *RSC Advances*. 2019;9(20):1530–1537.
- Kristiansen E, Zachariassen KE. The mechanism by which fish antifreeze proteins cause thermal hysteresis. *Cryobiology*. 2005;51(3):262–280. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.07.007>
- Pertaya N, Marshall BCh, Celik Y. Direct visualization of spruce budworm antifreeze protein interacting with ice crystals: basal plane affinity confers hyperactivity. *Biophys J*. 2008;95(1):333–341. DOI: <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.125328>
- De Vries AL, Wohlschlag DE. Freezing resistance in some Antarctic fishes. *Science*. 1969;163(3871):1073–1075. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.163.3871.1073>.
- Carpenter JF, Hansen TN. Antifreeze protein modulates cell survival during cryopreservation: mediation through influence on ice crystal growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89:8953–8957. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.89.19.8953>.
- Tachibana Y, Fletcher GL, Fujitani N. Antifreeze glycoproteins: elucidation of the structural motifs that are essential for antifreeze activity. *Angew. Chem., Int Ed*. 2004;43:856–862. DOI: <https://doi.org/10.1002/ange.200353110>
- Peltier R, Brimble MA, Wojnar J M. Synthesis and antifreeze activity of fish antifreeze glycoproteins and their analogues. *Chem. Sci*. 2010;1:538–551.
- Wilkinson BL, Stone RS, Capicciotti CJ. Total Synthesis of Homogeneous Antifreeze Glycopeptides and Glycoproteins. *Angew. Chem., Int. Ed*. 2012;1:3606–3610. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2368-z>.
- Koshimoto C, Mazur P. Effect of warming rate, temperature and antifreeze proteins on the survival of mouse spermatozoa frozen at an optimal rate. *Cryobiology*. 2002;45:49–59. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0011-2240\(02\)00105-0](https://doi.org/10.1016/s0011-2240(02)00105-0).
- Gibson MJ, Barker CA, Spains SG. Inhibition of crystal growth by synthetic glycopolymers: implication for the rational design of antifreeze glycoprotein mimics. *Biomacromolecules*. 2009;10:328–333. DOI: <https://doi.org/10.1021/bm801069x>.
- Matsumura K, Hyon SH. Polyampholytes as low toxic efficient cryoprotective agents with antifreeze protein properties. *Biomaterials*. 2009;30:4842–4849. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.05.025>.
- Congdon T, Notman R, Gibson M. Antifreeze (glyco) protein mimetic behavior of poly (vinyl alcohol): detailed structure ice recrystallization inhibition activity study. *Biomacromolecules*. 2013;14:1578–1586. DOI: <https://doi.org/10.1021/bm400217j>

23. Weng L, Swee A, Toner M. Role synthetic antifreeze agents in catalyzing ice nucleation. *Cryobiology*. 2018;84:91–94. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.08.010>.
24. Bercea M, Morariu S, Rusu D. In situ gelation of aqueous solutions of entangled poly(vinylalcohol). *Soft Matter*. 2013;9:1244–1253.
25. Hvozdiuk YaV, Chekanova VV, Pakhomova YuS, Kompaniyets AM. Fyzyko-khimichni vlastyivosti ta kriozakhysna diya rozhyvnyv polivinilovoho spyrtu, hlitserynu ta seredovyshch na osnovi yikh kombinatsiy pry zamorozhuvanni erytrotsytyv. *Problemy kriobiologii I kriomedycyny*. 2020;30(3):288. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo30.03a.288>. [in Ukrainian].
26. Hvozdiuk YaV, Pakhomova YuS, Chekanova VV, Kompaniyets AM. Kriozakhysna diya kriokonservantiv na osnvi 1,2-PD ta polivinilovoho spyrtu (m. m. 9 kDa) pry povil'nomu okholodzhenni erytrotsytyv lyudyny. *Scientific collection «Interconf»*. 2021;48:783–785. [in Ukrainian].
27. Hvozdiuk YaV, Dyubko TS, Kompaniyets AM. Vplyv zamorozhuvanya-vidihrivu pid zakhystom polivinilovoho spyrtu (m. m. 9 kDa) na bilky erytrotsytyv. *Scientific collection «Interconf»*. 2021;65:128–132. [in Ukrainian].
28. Liu S, Wang W, von Moos E. In vitro studies of antifreeze glycoprotein (AFGP) and a C-linked AFGP analogue. *Biomacromolecules*. 2007;8:1456–1462. DOI: <https://doi.org/10.1021/bm061044o>.
29. Gibson MJ. Slowing the growth of ice with synthetic macromolecules beyond antifreeze (glyco)proteins. *Polym. Chem*. 2010;1:1141–1152.
30. Huggins CE. Prevention of hemolysis volumes of red blood cells slowly frozen and thawed in the presence of dimethylsulfoxide. *Transfusion*. 1963;31:483–493.

ДОСЛІДЖЕННЯ У ПОРІВНЯЛЬНОМУ АСПЕКТІ КРІОЗАХИСНОЇ ДІЇ КРІОКОНСЕРВАНТІВ НА ОСНОВІ ГЛІЦЕРИНУ В КОМБІНАЦІЇ З ПОЛІВІНІЛОВИМ СПИРТОМ РІЗНИХ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАС ПРИ ШВИДКОМУ ТА ПОВІЛЬНОМУ ОХОЛОДЖЕНІ ДОНОРСЬКОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ

Гвоздюк Я.В. Компанієць А.М.

Резюме. Формування та зростання кристалів льоду як в біологічній клітині так і поза її межами створює серйозну проблему при розробці способів і технологій криоконсервування біологічних об'єктів для подальшого використання. Тому протягом декількох років проблема з пошуку та використання сполуки, здатної створювати вплив на процеси льодоутворення, особливо – на процес рекристалізації, наразі активно досліджуються в наукових закладах різних країн світу.

Однією з важливих причин загибелі клітин є рекристалізація льоду на етапі відігріву. Пригнічення рекристалізаційної активності є бажаним ефектом який може значно покращити збереженість криоконсервованого матеріалу.

На сьогоднішній день головною проблемою є розробка ефективних засобів криозахисту, нових криоконсервантів які матимуть посилену дію на процеси пригнічення рекристалізації льоду, що в свою чергу буде сприяти покращенню криозбереженості не тільки клітин а й тканин і органів людини.

Проте існує низка важливих перешкод з якими дослідники стикнулися в практиці криоконсервування: це дуже мала кількість сполук, які можна отримати з природних ресурсів, складність або неможливість повного хімічного синтезу аналогів; суперечливі данні щодо ефективності використання цих сполук при криоконсервуванні біоматеріалу; цитотоксичність та імуногенність природних антифризних білків. У зв'язку з цими перешкодами в останні роки дослідники звертають свою увагу на синтетичні сполуки, яким теж подібно природним притаманна специфічна антирекристалізаційна активність без побічних ефектів.

Вирішенням поставленої задачі є розробка криоконсервантів, в яких поряд з традиційними криопротекторами будуть використовуватися синтетичні сполуки-антифризи, яким притаманна специфічна антирекристалізаційна активність. З переліку цих сполук увага дослідників прикута до синтетичного полімеру – полівінілового спирту (ПВС).

Метою нашого дослідження було дослідити властивості ПВС різних молекулярних мас як активного інгібітора рекристалізації льоду та рівень збереженості еритроцитів в процесі повільного та швидкого заморожування-відігріву в криозахисних середовищах на основі стандартного криопротектора гліцерину різних концентрацій.

Об'єкт і методи дослідження. Об'єктом дослідження був еритроконцентрат, отриманий з донорської крові людини групи А(II), заготовленої на гемоконсерванті «Глюгіцер». Еритроконцентрат отримували центрифугуванням консервованої донорської крові при 1250 g протягом 25 хв. Отриманні данні розраховували за наступними показниками: концентрація вільного гемоглобіну в надосадовій рідині та загального гемоглобіну клітинної суспензії, визначали гемоглобінціанідним методом за допомогою набору «Гемоглобін Спл 200» (Україна) та спектрофотометру КФК-3–01 «ЗОМЗ» (Росія) довжина хвилі 540–545 нм., показник гематокриту – визначали на центрифугі СМ-70, процент гемолізу еритроцитів в надосаді розраховували за формулою наведеною в роботі Huggins CE. (Prevention of hemolysis of large volumes of red blood cells slowly frozen and thawed in the presence of dimethylsulfoxide).

Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію Манна-Уїтні для малих вибірок з використанням програмного пакету «Statistica».

Результати. В результаті проведеного порівняльного дослідження криозахисних середовищ різного складу криопротекторів з розчинами полівінілового спирту при швидкому методі заморожування клітин крові зокрема (еритроцитів) шляхом занурення зразків до рідкого азоту. Встановлено, що після заморожування-відігріву еритроцитів у багатокомпонентних розчинах на основі гліцерину в комбінації з ПВС м. м. 9 і 31 кДа спостерігається тенденція до підвищення збереженості еритроцитів за результатами гемолізу у порівнянні з дією 20 %, 30 % і 40 %-х монорозчинів гліцерину.

Ключові слова: еритроцити, криоконсервація, рекристалізація, полівініловий спирт, гліцерин.

RESEARCH IN COMPARATIVE ASPECT OF CRYOPROTECTIVE ACTION OF GLYCERIN-BASED CRYOPRESERVATIVES IN COMBINATION WITH POLYVINYL ALCOHOL OF DIFFERENT MOLECULAR WEIGHTS AT FAST AND SLOW COOLING OF HUMAN DONOR BLOOD

Hvozdiuk Y.V., Kompaniets A.M.

Abstract. The formation and growth of ice crystals both inside and outside the biological cell pose a serious problem in the development of methods and technologies for cryopreservation of biological objects for further use. Therefore, for several years the problem of finding and using a compound that can influence the processes of ice formation, especially the recrystallization process, is currently being actively studied in scientific institutions around the world.

One of the important causes of cell death is the recrystallization of ice at the thawing stage. Inhibition of recrystallization activity is a desirable effect that can significantly improve the safety of cryopreserved material.

Today the main problem is the development of effective means of cryoprotection, new cryoprotectants that will have an enhanced effect on the inhibition of ice recrystallization, which in turn will improve the cryopreservation of not only cells but also human tissues and organs.

However, there are a number of important obstacles that researchers have encountered in the practice of cryopreservation: the very small number of compounds that can be obtained from natural resources, the complexity or impossibility of complete chemical synthesis of analogues; contradictory data on the effectiveness of the use of these compounds in cryopreservation of biomaterial; cytotoxicity and immunogenicity of natural antifreeze proteins. In connection with these obstacles, in recent years, researchers have turned their attention to synthetic compounds, which are also similar to natural specific antirecrystallization activity without side effects.

The solution to this problem is the development of cryoprotectants, which, along with traditional cryoprotectants will use synthetic compounds – antifreeze, which has a specific antirecrystallization activity. From the list of these compounds, the attention of researchers is focused on a synthetic polymer – polyvinyl alcohol (PVA).

The aim of our study was to investigate the properties of PVA of different molecular weights as an active inhibitor of ice recrystallization and the level of preservation of erythrocytes in the process of slow and rapid freezing – heating in cryoprotective media based on standard cryoprotectant glycerin of different concentrations.

Materials and methods. The material of the study was erythroconcentrate obtained from human donor blood group A (II), prepared on the hemopreservative «Glugetsir». Erythroconcentrate was obtained by centrifugation of canned donor blood at 1250 g for 25 minutes. The obtained data were calculated according to the following indicators: the concentration of free hemoglobin in the supernatant and total hemoglobin of cell suspensions, determined by hemoglobin cyanide method using the kit «Hemoglobin SPL 200» (Ukraine) and spectrophotometer KFK – wave – 3–01 «ZOMZ», 540–545 nm, hematocrit was determined on a centrifuge «SM-70», the rate of hemolysis of erythrocytes in the supernatant was calculated by the formula given in Huggins CE. (Prevention of hemolysis of large volumes of red blood cells slowly frozen and thawed in the presence of dimethylsulfoxide).

Statistical processing of the results was performed using the Mann-Whitney test for small samples using the software package «Statistics».

Analysis of results. As a result of a comparative study of cryoprotective media of different composition of cryoprotectants with solutions of polyvinyl alcohol in the rapid method of freezing blood cells in particular (erythrocytes) by immersing the samples in liquid nitrogen. It was found that after freezing -heating of erythrocytes in multicomponent solutions based on glycerol in combination with PVA m. m. 9 and 31 kDa, there is a tendency to increase the preservation of erythrocytes by hemolysis in comparison with the action of 20 %, 30 %, 40 % glycerol mono solutions.

Key words: erythrocytes, cryopreservation, recrystallization, polyvinyl alcohol.

ORCID кожного автора та їх внесок до статті:

Hvozdiuk Y.V.: 0000–0001–9377–4678^{BCDEF}

Kompaniets A.M.: 0000–0002–0633–7937^{ABE}

Конфлікт інтересів:

Автори статті підтверджують відсутність конфлікту інтересів.

Адреса для кореспонденції

Гвоздюк Яна Василівна

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Адреса: Україна, 61015. м. Харків, вул. Переяславська 23

Тел.: +380573734143

E-mail: yana.hvozdiuk@gmail.com

A – концепція роботи та дизайн, B – збір та аналіз даних, C – відповідальність за статичний аналіз, D – написання статті, E – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті.

Стаття надійшла 15.11.2021 року
Стаття прийнята до друку 01.05.2022 року