

PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES AND CRYO PROTECTIVE EFFECT OF COMBINED ENVIRONMENTS BASED ON 1,2-PROPANEDIOL IN COMBINATION WITH POLYVINYL ALCOHOL MOLECULAR WEIGHTS 9 kDa

Institute of Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv, Ukraine)

yana.hvozdiuk@gmail.com

The physico-chemical properties of combined media containing PVA with a molecular weight of 9 kDa and 20-40% solutions of cryoprotectant 1,2-propanediol (1,2-PD) were studied to characterize hydrophilic-hydrophobic interactions in these solutions. From the list of physicochemical properties of cryoprotectant solutions, dynamic viscosity and surface activity are of particular interest to cryobiologists. The surface activity of cryoprotectant solutions, which is determined at the boundary of the water-nonpolar media phase distribution, gives an idea of the ability of substances to adsorb on the surface of the cell membrane; dynamic viscosity of cryoprotectant solutions - about the interaction of substances with water. It was established that the viscosity and density indicators increase with the increase in the concentration of 1,2-PD and PVA, which, in turn, indicates an increase in the hydrophilicity of the combined media. The surface tension index of the combined media decreased due to the change in the structure of 1,2-PD-PVA, which leads to a decrease in the hydrophobicity of these media. Combined media containing 1,2-PD and PVA can form micelles in the liquid phase.

Cryoprotective media of different composition based on the combination of endocellular 1,2-propanediol (1,2-PD) with solutions of polyvinyl alcohol (PVA) during freezing of erythrocytes were studied. After freezing-thawing of erythrocytes in multicomponent solutions based on 1,2-PD with PVA of molecular weight 9 kDa, there is a tendency to increase the preservation of erythrocytes as a result of hemolysis in comparison with the effect of 20%, 30%, and 40% monosolutions of 1,2-PD. When erythrocytes were frozen in solutions containing a combination of PVA with the cryoprotectant 1,2-PD, at a slow controlled speed (3°C/min.), the highest cell preservation rates were obtained for the media of 30% 1,2-PD +0.2% PVA. This solution made it possible to preserve 89% of erythrocytes with low osmotic fragility. The preservation of erythrocytes depends on the composition of the combined media: on the molecular weight of PVA, the concentration of solutions of individual cryoprotectants and PVA.

Key words: erythrocytes, hemolysis, hematocrit, hydrophilic-hydrophobic interactions, viscosity, surface tension, 1,2-PD, PVA.

Connection of the publication with planned research works.

The studies were carried out as part of the research works of the laboratory of cryoprotectants of the Institute of Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine «Investigation of the properties of polyvinyl alcohol as an inhibitor of recrystallization in cryoprotective media based on endo- and exocellular cryoprotectants» (state registration number 0116U003492) and «Investigation of cryoprotective properties of media based on combinations of penetrating cryoprotectants with polyvinyl alcohol during cryopreservation of human erythrocytes» (state registration number 0121U109456).

Introduction.

Finding new highly effective cryoprotective media for cryopreservation of human erythrocytes and optimal temperature regimes for their long-term storage is one of the priority tasks of modern cryobiology. Some time ago, it was considered most expedient to combine penetrating and non-penetrating cryoprotectants in a cryopreservative. The goal of this approach is to inhibit the growth of external and internal ice crystals during cooling. Secondly, cell membrane stabilization at the stages of cryopreservation [1-4].

To create modern effective cryopreservatives, a new approach was applied with the use of 1,2-PD with amphiphilic properties and enhanced effect on the crystal formation process, which was previously studied as a cryoprotectant in the cryopreservation of erythrocytes

[2]. Low toxicity of 1,2-propanediol, stability during storage attracted attention to the use of this diol. Combined media containing 1,2-propanediol and the use in their composition of PVA with a molecular weight of 9 kDa, which in low concentrations exhibits the properties of an effective recrystallization inhibitor, and contributes to increasing the freezing efficiency of some cells, including erythrocytes [5-10].

Development and research of new cryoprotective media, optimization of blood cell cryopreservation stages will contribute to increasing the efficiency of erythrocyte cryopreservation for practical use [11-14].

The aim of the study.

To study the physicochemical properties and cryoprotective action of media of different composition based on the combination of the endocellular cryoprotectant 1,2-propanediol with 9 kDa polyvinyl alcohol solutions during erythrocyte freezing.

Object and research methods.

Solutions of 1,2-propanediol (Germany), polyvinyl alcohol (Sigma-Aldrich, USA) were used for the research. PVA solutions were prepared using the weight method on the basis of 0.1 M phosphate-salt buffer (pH 7.4), 1,2-PD solutions were prepared on the basis of 0.9% NaCl, the concentration of the solutions was expressed in mass percentages (wt%). All solutions were used after 24-hour exposure at a temperature of (20±2)°C.

The object of the study was erythrocyte concentrate obtained from human donor blood of group A(II)⁺, prepared with the hemopreservative «Glyugitsir» in the

KRBTC, which was stored for no more than 48 hours at a temperature of $(4\pm 2)^{\circ}\text{C}$. Erythroconcentrate was obtained by centrifugation of preserved donor blood at 1250 g for 25 minutes, the percentage of hemolysis of erythrocytes in the supernatant was calculated as described in [15].

To study the effect of combined media on the preservation of erythrocytes after cryopreservation, compositions with different compositions were studied. When investigating the cryoprotective effect of combined media based on 1,2-PD in combination with PVA m.m. 9 kDa on human erythrocytes to erythroconcentrate by drip methods within 5 minutes at a temperature of $(20\pm 2)^{\circ}\text{C}$, cryoprotective solutions were added in a ratio of 1:1 by volume. The control was erythrocytes that were frozen in 20%, 30% and 40% solutions of 1,2-PD.

The studied samples were frozen in «Nunc» cryoampules (1.8 ml) in the program freezer «UOP-6» with an average cooling rate of $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Frozen samples were stored in liquid nitrogen at -196°C for 1-3 weeks. The samples were heated in a water bath at a temperature of $40 - 42^{\circ}\text{C}$ with constant shaking of the containers.

Thawed erythrocytes were washed from combined cryoprotective solutions using the method of threefold serial centrifugation using standard sucrose-salt solutions [11].

An Ostwald viscometer was used to determine the physicochemical properties – viscosity, surface tension and micelle formation of the combined solutions were determined using the stalagmometric method described in [12].

Research results and their discussion.

For the development of new cryopreservatives containing PVA, some scientists establish the influence of physicochemical properties on the preservation of cells [3, 4, 13, 16-20]. To study the effect of multi-component cryoprotective media on the preservation of erythrocytes after cryopreservation, compositions with different compositions were studied, and the highest indicators of preservation of erythrocytes were determined. In this regard, indicators of the physicochemical properties of 20%-40% solutions of 1,2-PD in combination with 0.1%, 0.2%, 0.5% solutions of PVA with a molecular weight of 9 kDa were investigated.

PVA is an artificial, water-soluble, thermoplastic polymer that has hydroxyl and methylene groups. As a rule, PVA is a weakly branched polymer. The centers of branching are the weakest points of the polymer chain and behind them the chain breaks during the saponification reaction. The degree of polymerization (*p*) of PVA is 500-25

Table 1 presents the physical and chemical properties of combined media, which include 1,2-PD and PVA.

The conducted studies showed that the combination of cryoprotectants 1,2-PD and PVA of molecular weight 9 kDa in cryoprotective solutions, which belong to different chemical compounds, changes the physicochemical parameters of these environments. Thus, the surface tension of combined media, which include 20%-40% solutions of 1,2-PD and 0.1%, 0.2%, 0.5% solutions of PVA with a molecular weight of 9 kDa, decreases with increasing concentration 1,2-PD and PVA from 0.1% to 0.5%, at the same time the viscosity indicators increase. The decrease in surface tension indicators is explained by the fact that 1,2-PD and PVA compounds

Table 1 – Physico-chemical properties of combined media containing 1,2-PD and PVA, m.m. 9 kDa

Concentration in solutions of combined media,%	Surface tension, mg/m ²	Density,g/cm ³	Viscosity, Pa·s, 10 ⁻³
20% 1,2- PD +0,1% PVA	51,22	0,9998	1,670
20% 1,2- PD +0,2% PVA	50,83	1,0028	2,903
20% 1,2- PD +0,5% PVA	48,19	1,0098	3,074
30% 1,2- PD +0,1% PVA	48,15	1,0087	4,681
30% 1,2- PD +0,2% PVA	47,83	1,0255	4,720
30% 1,2- PD +0,5% PVA	46,66	1,0276	4,997
40% 1,2- PD +0,1% PVA	46,23	1,0039	7,108
40% 1,2- PD +0,5% PVA	45,28	1,0232	7,132

are adsorbed on particles of the dispersion phase (positive adsorption), which, due to the orientation of their molecules on the surface of the phase distribution, reduces the surface tension in the solution. The surface tension indicators of the cryoprotective media with a content of 20% 1,2-PD and 0.1% PVA with a molecular weight of 9 kDa have the highest values. The more the surface tension decreases with increasing concentration of substances, the greater the surface activity. It was previously shown by the authors in work [21] that PVA molecules have an ordered arrangement of hydrophobic groups capable of forming local cavities with increased hydrophobicity, in particular, PVA can rearrange its structure in the presence of external molecules. That is, the structure of polyvinyl alcohol, which is in solution, determines the efficiency of its adsorption on the surface of ice or the orientation of the hydrophobic groups of the polymer on this surface. These studies echo the results presented in [22], in which it was confirmed that PVA polymers m.m. 9 kDa are able to form local, hydrophobic regions, the presence of which can affect their recrystallization activity. However, the combination of PVA solutions with 20%-40% 1,2-PD solutions leads to a change in the structure of the PVA-1,2-PD complex and a decrease in hydrophobic areas [22].

The analysis of the physicochemical properties of combined media containing 1,2-PD and PVA shows that the highest viscosity indicators have media containing (40% 1,2-PD+0.5% PVA, m.m. 9kDa). This phenomenon is characterized by a relaxation effect that depends on the shape of the relaxation spectrum and is determined by the polydispersity of the polymer [23].

Therefore, on the basis of previous studies, we can assume that the combination of PVA polymer with a molecular weight of 9 kDa with cryoprotectant 1,2-PD in combined cryoprotective media leads to an increase in hydrophilicity and a decrease in hydrophobicity of these media.

Cryoprotectant 1,2-PD and polyvinyl alcohols belong to the class of surfactants (surfactants). Determining the critical concentrations of micelles (CCM) of surfactant solutions is important for the description of adsorption. Micelle formation can be considered as an intermediate phenomenon between phase separation and micelle formation. Previously, works [24-26] investigated the micelle formation of oxyethylene glycerol with a degree of polymerization *n*=5, combined media based on oxyethylene glycerol with a degree of polymerization *n*=25, polyvinyl alcohols of different molecular weights (9, 31, 72 kDa). Our goal was to study the process of micelle

formation in solutions of combined media containing 1,2-PD and PVA with a molecular weight of 9 kDa.

Table 2 presents experimental data, based on which we observe the dependence of surface tension on concentration: with increasing concentration, the surface tension of combined media containing 1,2-PD and PVA with a molecular weight of 9 kDa decreases. By calculating the values of the surface tension indicators, a surface tension isotherm was constructed in logarithmic coordinates $\lg C$ of solutions of combined media (**fig.**). Curves are defined on the surface tension isotherm, one of which reflects the properties of systems in the molecular state, and the second – in the colloidal state.

Table 2 – Surface tension of aqueous solutions of combined media containing 1,2-PD and PVA with a molecular weight of 9 kDa

P	Concentration in combined environments 1,2-PD:PVA, %	Surface tension, mg/m ²
1	0,05	52,28
2	0,07	51,86
3	0,10	51,13
4	0,15	51,16
5	0,25	50,40
6	2,50	49,66

Figure shows the surface tension isotherm of solutions of a combined media containing 1,2-PD and PVA with a molecular weight of 9 kDa. In the area of low concentrations, a curvilinear section is observed, which at the intersection with the straight line forms CCM₁ ($\lg 0.60$) and is equal to the value of 0.25% and describes the properties of the system in the molecular state. The concentration at which changes in micellar properties begin is called CCM₂, which is associated with the completion of spherical micelles in these solutions and has a value of 2.5%. Indicators of surface tension decrease sharply.

Hydrophobic PVA chains with a molecular weight of 9 kDa ensure the formation of hydrophobic cavities in the structure of micelles [22], which are able to reduce recrystallization activity, therefore, we assume that the combined media have the activity of an inhibitor of ice recrystallization.

Our goal was to study the influence of solutions of polyvinyl alcohol m.m. 9 kDa (0, 2% and 1%) when adding to 20%, 30%, 40% solutions of cryoprotectant 1,2-PD

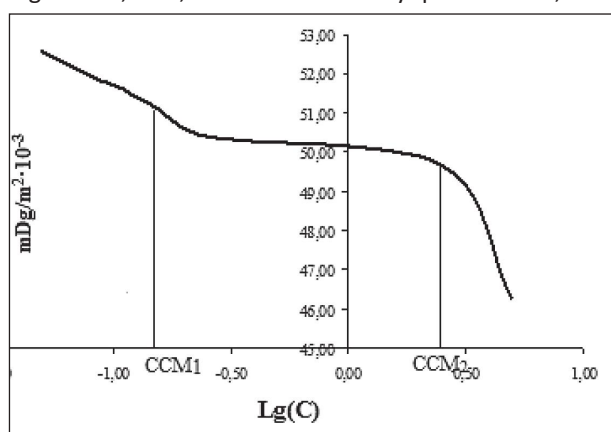


Figure – Dependence of the surface tension of the combined media 1,2-PD:PVA 9 kDa on the logarithm of the solution concentration.

on the cryoprotective effect of the obtained combined media. As a hydrophilic compound, it deserves special attention polyvinyl alcohol, which has a sufficiently large number of hydroxyl groups. It is likely that due to this structure, this substance can have cryoprotective properties and have a protective effect on cells during freezing. In studies [6], it was shown the possibility of increasing the viability of cryopreserved sheep and human erythrocytes, mesenchymal cells and sperm. Experiments were conducted on freezing erythrocytes of human donor blood at a speed of 3°C/min. The control was erythrocytes, which were frozen in 20%, 30%, 40% solutions of 1,2-PD.

It was observed that the freezing of erythrocytes at a rate of 3°C/min. in combined solutions containing 20% 1,2-PD, 20% 1,2-PD +0.2% PVA, 20% 1,2-PD +1% PVA, leads to almost complete death of erythrocytes after thawing (**table 3**). When cells were frozen in 40% 1,2-PD, as well as in media 40% 1,2-PD+0.2% PVA, 40% 1,2-PD+1% PVA, the number of preserved cells was higher than in solutions based on 20% 1,2-PD, but more than 50% of erythrocytes after thawing were hemolyzed, which indicates low cryoprotective activity of these solutions. Combined media containing 1,2-PD and PVA have the ability to form micelles in the liquid phase and are determined by the critical concentration of micelles (CCM). It was established that at a value of CCM of the cryoprotective media of 0.25%, the properties of the system are described in the molecular state. At a concentration (CCM 2.5%), changes in micellar properties and the formation of spherical micelles begin [10]. Micellar fractions during freezing of erythrocytes disrupt the integrity of the membrane, the permeability of membranes to water increases, which leads to osmotic shock of membrane systems and to complete or partial death [14].

The greatest preservation of erythrocytes, which were frozen with at a rate of 3°C/min. obtained in the following combined solutions: 30% 1,2-PD+0.2% PVA and 30% 1,2-PD+1% PVA. It was found that the combined solution containing 30% 1,2-PD and 0.2% PVA allows to significantly reduce the hemolysis of erythrocytes after rewarming in comparison with the 30% solution of 1,2-PD. The value of hemolysis of erythrocytes during the procedure for removing 1,2-PD from cells using sucrose-salt solutions is shown in **table 3** and equals 11%. The effectiveness of the amphiphilic compound 1,2-PD is probably due to the peculiarities of the physicochemical properties of 1,2-PD (surface tension, dynamic viscosity, from the ratio of PVA and 1,2-PD, concentrations of compounds in combined media, freezing speed, which were used (**table 1**). Perhaps the structure of 1,2-PD allows to successfully prevent membrane defects, as the compound is embedded in the protein-lipid layer of the erythrocyte cell membrane. The ratio in the combined media of 30% 1,2-PD + 0.2% PVA is optimal for the preservation of erythrocytes after freezing. Combining in a cryoprotective media 30% 1,2-PD and 1% PVA (the level of erythrocyte hemolysis is 22%), on the contrary, led to an increase in the number of hemolyzed cells in comparison with 30% 1,2-PD and a solution of the combined media 30% 1,2-PD+0.2% PVA.

It is shown that the highest cryoprotective activity is when freezing erythrocytes at a speed of 3°C/min and is possessed by a solution of a combined media containing 30% 1,2-PD+0.2% PVA. The combined media preserves

89% of erythrocytes, is non-toxic to human erythrocytes and exhibits cryoprotective activity during slow cooling of cells.

The analysis of the obtained results indicates the importance of the mode and method of freezing erythrocytes, provided that 1,2-PD is used as a cryoprotectant, and the need for further studies of the effectiveness of combined media (1,2-PD + PVA) in different programs and methods of cooling.

Conclusions.

The investigated cryoprotective effect is based on the combination of the penetrating cryoprotectant 1,2-propanediol with polyvinyl alcohol. 9 kDa on the preservation of erythrocytes of human donor blood. The use of 1,2-PD in combination with PVA at a concentration of 0.2% made it possible to reduce damage to thawed cells at the washing stage.

A solution of a combined media containing 30% 1,2-PD+0.2% PVA has high cryoprotective activity when freezing erythrocytes at a speed of 3°C/min.

With an increase in the concentration of 1,2-PD, PVA solutions in combined media, the viscosity and density increase, which indicates an increase in the hydrophilicity of the studied solutions. We assume that, in combined environments that include 1,2-PD+PVA, structural changes occur when 1,2-PD solutions are added to PVA, the hydrophobicity of PVA decreases due to the presence of alkyl groups in 1,2-PD solutions.

Combined media based on the combination of 1,2-PD and PVA have the ability to form micelles in the liquid phase. Combined media with PVA with a molecular

Table 3 – Indicators of stability of human erythrocytes in solutions of combined media 1,2-PD+PVA with m.m. 9 kDa after thawing (M±m)

Solutions of combined media,%	Hemolysis, %
20%1,2- PD	100±5
20%1,2PD +0,2% PVA	100±5
20%1,2- PD +1% PVA	97±3
30%1,2- PD	16±1,1
30%1,2PD +0,2% PVA	11±0,9
30%1,2 PD +1% PVA	22±1,8
40%1,2- PD	70±1,6
40%1,2- PD +1% PVA	85±3,4
40%1,2PD +0,2% PVA	80±2,5

weight of 9 kDa are able to form mixed micelles and PVA molecules are adsorbed on the surface of the micelles, which ensure the formation of hydrophobic cavities in the micelle structure and are able to reduce recrystallization activity, therefore, we can assume that the combined media have the property of a recrystallization inhibitor.

Prospects for further research.

In our opinion, today it is promising to study and conduct further research, aimed at the development of new cryoprotective media in combination with polyvinyl alcohol for freezing erythrocytes, optimization of the stages of cryopreservation of blood cells will contribute to increasing the efficiency and cryopreservation of erythrocytes for practical use.

DOI 10.29254/2077-4214-2024-3-174-98-107

УДК 612.111:57.086.13:547.422+678.744

Чеканова В. В., Гвоздюк Я. В., Пахомова Ю. С., Компанієць А. М.

ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ТА КРІОЗАХИСНА ДІЯ КОМБІНОВАНИХ СЕРЕДОВИЩ НА ОСНОВІ 1,2-ПРОПАНДІОЛУ В КОМБІНАЦІЇ З ПОЛІВІНІЛОВИМ СПИРТОМ МОЛЕКУЛЯРНОЇ МАСИ 9 кДа

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

yana.hvozdiuk@gmail.com

Досліджені фізико-хімічні властивості комбінованих середовищ, які містять ПВС молекулярної маси 9 кДа та 20-40% розчини кріопротектора 1,2-пропандіола (1,2-ПД), що характеризують гідрофільно-гідрофобні взаємодії у цих розчинах. З переліку фізико-хімічних властивостей розчинів кріопротекторів інтерес для кріобіологів представляє динамічна в'язкість та поверхнева активність. Поверхнева активність розчинів кріопротекторів, яка визначена на межі розподілу фаз вода-неполярна середа, дає представлення про здібності речовин адсорбуватися на поверхні клітинної мембрани; динамічна в'язкість розчинів кріопротекторів про взаємодію речовин з водою. Встановлено, що показники в'язкості і густини збільшуються з підвищенням концентрації 1,2-ПД і ПВС, що свідчить про збільшення гідрофільності комбінованих середовищ. Показник поверхневого натягу комбінованих середовищ зменшувався внаслідок зміни структури 1,2-ПД-ПВС, що призводить до зменшення гідрофобності цих середовищ. Комбіновані середовища з вмістом 1,2-ПД та ПВС здатні до міцелоутворення у рідкій фазі.

Досліджували кріозахисні середовища різного складу на основі комбінації ендоецелюлярного 1,2-пропандіола (1,2-ПД) з розчинами полівінілового спирту (ПВС) при заморожуванні еритроцитів. Після заморожування-відтавання еритроцитів у багатокомпонентних розчинах на основі 1,2-ПД з ПВС молекулярної маси 9 кДа спостерігається тенденція до підвищення збереженості еритроцитів за результатами гемолізу у порівнянні з дією 20%, 30% та 40% монорозчинів 1,2-ПД. При заморожуванні еритроцитів у розчинах, які містили поєднання ПВС з кріопротектором 1,2-ПД, з повільною контрольованою швидкістю (3°C/хв.), найбільш високі показники збереженості клітин отримано для середовища 30% 1,2-ПД +0,2% ПВС. Цей розчин дозволяв зберегти 89 % еритроцитів з низькою осмотичною крихкістю. Збереженість еритроцитів залежить від складу комбінованого середовища: від молекулярної маси ПВС, концентрації розчинів окремих кріопротекторів та ПВС.

Ключові слова: еритроцити, гемоліз, гематокрит, гідрофільно-гідрофобні взаємодії, в'язкість, поверхневий натяг, 1,2-ПД, ПВС.

Зв'язок роботи з плановими науково-дослідними роботами.

Дослідження виконувалися у рамках науково-дослідних робіт лабораторії кріопротекторів Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України «Дослідження властивостей полівінілового спирту як інгібітора рекристалізації у криозахисних середовищах на основі ендо- і екзоцелюлярних кріопротекторів» (№ державної реєстрації 0116U003492) та «Дослідження криозахисних властивостей середовищ на основі комбінацій проникаючих кріопротекторів з полівініловим спиртом при кріоконсервуванні еритроцитів людини» (№ державної реєстрації 0121U109456).

Вступ.

Пошук нових вискоєфективних криозахисних середовищ для кріоконсервування еритроцитів людини та оптимальних температурних режимів для їх довгострокового зберігання є однією з пріоритетних задач сучасної кріобіології. Деякий час тому найбільш доцільним вважалося об'єднувати у кріоконсерванті проникаючі та непроникаючі кріопротектори. Ціль такого підходу інгібування росту поза- та внутрішніх кристалів льоду при охолодженні. По-друге стабілізація мембрани клітин на етапах кріоконсервування [1-4].

Для створення сучасних ефективних кріоконсервантів використано новий підхід з використанням розчинів які володіють амфільними властивостями, 1,2-ПД і посиленою дією на процес кристалотворення, який раніше досліджувався у якості кріопротектора при кріоконсервуванні еритроцитів [2]. Низька токсичність 1,2-пропандіолу, стійкість при збереженні залучили увагу до використання цього діолу. Комбіновані середовища з вмістом 1,2-пропандіолу та використання у їх складі ПВС молекулярних мас 9 кДа, який в малих концентраціях впливає на властивості ефективного інгібітора рекристалізації, і сприяє підвищенню ефективності заморожування деяких клітин, в тому числі еритроцитів [5-10].

Розробка і дослідження нових криозахисних середовищ, оптимізація етапів кріоконсервування клітин крові буде сприяти підвищенню ефективності кріозбереження еритроцитів для практичного застосування [11-14].

Мета дослідження.

Дослідження фізико-хімічних властивостей та криозахисної дії середовищ різного складу на основі комбінації ендоцелюлярного кріопротектору 1,2-пропандіолу з розчинами полівінілового спирту 9 кДа при заморожуванні еритроцитів.

Об'єкт і методи дослідження.

Для проведення дослідження використовували розчини 1,2-пропандіолу (Німеччина), полівініловий спирт («Siga-Aldrich», США). Розчини ПВС готували ваговим методом на основі 0,1 М фосфатно-сольового буферу (рН 7,4), розчини 1,2-ПД готували на основі 0,9% NaCl, концентрацію розчинів виражали у масових відсотках (мас.%). Всі розчини використовували після 24-годинної витримки при температурі (20±2)°С.

Об'єктом 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 (4±2)°С. Еритроконцентрат отримували методом цен-

трифугування консервованої донорської крові при 1250 g протягом 25хв., процент гемолізу еритроцитів в надосаді розраховували, як описано в роботі [15].

Для вивчення впливу комбінованих середовищ на збереженість еритроцитів після кріоконсервування було досліджено різні за складом композиції. При дослідженні криозахисної дії комбінованих середовищ на основі 1,2-ПД в комбінації з ПВС м.м. 9 кДа на еритроцити людини до еритроконцентрату крапельним методом протягом 5 хв. при температурі (20±2)°С додавали криозахисні розчини у співвідношенні 1:1 за об'ємом. Контролем були еритроцити, які були заморожені в 20%, 30% та 40% розчинах 1,2-ПД.

Досліджені зразки заморожували в кріоампулах «Nunc» (1,8 мл) у програмному заморожуванні «УОП-6» із середньою швидкістю охолодження 3°С/хв. Заморожені зразки зберігали у рідкому азоті при -196°С протягом 1-3 тижнів. Відігрівали зразки на водяній бані при температурі 40 – 42°С при постійному похитуванні контейнерів.

Розморожені еритроцити відмивали від комбінованих криозахисних розчинів методом трьохкратного серійного центрифугування з використанням стандартних сахарозно-сольових розчинів [11].

Для визначення фізико-хімічних властивостей – в'язкості використовували віскозиметр Оствальду, поверхневий натяг та міцелютворення комбінованих розчинів визначали за допомогою сталагмометричного метода описаного в роботі [12].

Результати дослідження та їх обговорення.

Для розробки нових кріоконсервантів, які містять ПВС, деякі вчені встановлюють вплив фізико-хімічних властивостей на збереженість клітин [3, 4, 13, 16-20]. Для вивчення впливу багатокомпонентних криозахисних середовищ на збереженість еритроцитів після кріоконсервування було досліджено різні за складом композиції, визначені найбільш високі показники збереженості еритроцитів. В зв'язку з цим, досліджені показники фізико-хімічних властивостей 20%-40% розчинів 1,2-ПД у комбінації з 0,1%, 0,2%, 0,5% розчинами ПВС молекулярної маси 9 кДа.

ПВС-штучний, водорозчинний, термопластичний полімер, який має гідроксильні та метиленові групи. Як правило, ПВС є слабо розгалуженим полімером. Центри розгалуженості є найбільш слабкими місцями полімерного ланцюга і за ними відбувається розрив ланцюга при реакції омилення. Ступінь полімеризації (n) ПВС складає 500-2500 .

В таблиці 1 представлені фізико-хімічні властивості комбінованих середовищ, до складу яких входять 1,2-ПД та ПВС .

Проведені дослідження показали, що поєднання у криозахисних розчинах кріопротекторів 1,2-ПД та ПВС молекулярної маси 9 кДа, які належать до різних хімічних сполук, змінює фізико-хімічні показники цих середовищ. Так, поверхневий натяг комбінованих середовищ, до складу яких входять 20%-40% розчини 1,2-ПД та 0,1%, 0,2%,0,5% розчини ПВС з молекулярною масою 9 кДа, зменшується з підвищенням концентрації 1,2-ПД та ПВС від 0,1% до 0,5%, в той же час показники в'язкості збільшуються. Зменшення показників поверхневого натягу пояснюється тим, що сполуки 1,2-ПД та ПВС адсорбуються на частинках дисперсійної фази (позитивна адсорбція), які із-за орієнтації їх молекул на поверхні розподілу

фаз знижують поверхневий натяг у розчині. Показники поверхневого натягу криозахисного середовища з вмістом 20% 1,2-ПД та 0,1% ПВС молекулярної маси 9 кДа мають найбільші значення. Чим більше зменшується поверхневий натяг з підвищенням концентрації речовин, тим більша поверхнева активність. Раніше було показано авторами в роботі [21], що в молекулах ПВС впорядковане розташування гідрофобних груп, що здатні до утворення локальних порожнин з підвищеною гідрофобністю, зокрема ПВС може перебудувати свою структуру в присутності зовнішніх молекул. Тобто, будова полівінілового спирту, який знаходиться в розчині, визначає ефективність його адсорбції на поверхні льоду або орієнтацію гідрофобних груп полімеру на цій поверхні. Ці дослідження перекликаються з наведеними результатами в роботі [22], в якій було підтверджено, що полімери ПВС м.м. 9 кДа здатні утворювати локальні, гідрофобні області, наявність яких може впливати на їх рекристалізаційну активність. Однак, поєднання розчинів ПВС з 20%-40% розчинами 1,2-ПД, призводить до зміни структури ПВС-1,2-ПД комплексу і зменшення гідрофобних областей [22].

Аналіз фізико-хімічних властивостей комбінованих середовищ з вмістом 1,2-ПД та ПВС свідчить, що найбільші показники в'язкості мають середовища з вмістом (40% 1,2-ПД+0,5% ПВС м.м. 9кДа). Це явище характеризується релаксаційним ефектом, який залежить від форми релаксаційного спектру, і визначається полідисперсністю полімеру [23].

Отже, на основі попередніх досліджень можемо припустити, що поєднання полімеру ПВС молекулярної маси 9 кДа з криопротектором 1,2-ПД у комбінованих криозахисних середовищах призводить до підвищення гідрофільності і зменшенню гідрофобності цих середовищ.

Кріопротектор 1,2-ПД та полівінілові спирти відносяться до класу поверхнево-активних речовин (ПАР). Визначення критичних концентрацій міцелоутворення (ККМ) розчинів ПАР має важливе значення для описання адсорбції. Міцелоутворення можна розглядати як проміжне явище між розподілом на фази і утворенням міцел. Раніше в роботах [24-26] досліджувалось міцелоутворення оксиетильованих гліцеринів зі ступенем полімеризації $n=5$, комбінованих середовищ на основі оксиетильованого гліцерину зі ступенем полімеризації $n=25$, полівінілових спиртів різних молекулярних мас (9, 31, 72 кДа). Нашою метою було дослідження процесу міцелоутворення у розчинах комбінованих середовищ з вмістом 1,2-ПД та ПВС молекулярної маси 9 кДа.

В таблиці 2 представлені експериментальні дані, на підставі яких спостерігаємо залежність поверхневого натягу від концентрації: з підвищенням концентрації поверхневий натяг комбінованих середовищ з вмістом 1,2-ПД і ПВС молекулярної маси 9 кДа знижується. Обраховуючи значення показників поверхневого натягу, побудована ізотерма поверхневого натягу у логарифмічних координатах $\lg C$ розчинів комбінованих середовищ (рис.). На ізотермі поверхневого натягу визначені криві, одна із яких відображає властивості систем в молекулярном стані, і друга в колоїдному.

Таблиця 1 – Фізико-хімічні властивості комбінованих середовищ з вмістом 1,2-ПД та ПВС м.м. 9 кДа

Концентрація в розчинах комбінованих середовищ, %	Поверхневий натяг, мдж/м ²	Густина, г/см ³	В'язкість, Па·с, 10 ⁻³
20% 1,2- PD +0,1% PVA	51,22	0,9998	1,670
20% 1,2- PD +0,2% PVA	50,83	1,0028	2,903
20% 1,2- PD +0,5% PVA	48,19	1,0098	3,074
30% 1,2- PD +0,1% PVA	48,15	1,0087	4,681
30% 1,2- PD +0,2% PVA	47,83	1,0255	4,720
30% 1,2- PD +0,5% PVA	46,66	1,0276	4,997
40% 1,2- PD +0,1% PVA	46,23	1,0039	7,108
40% 1,2- PD +0,5% PVA	45,28	1,0232	7,132

Таблиця 2 – Поверхневий натяг водних розчинів комбінованих середовищ з вмістом 1,2-ПД та ПВС молекулярної маси 9 кДа

п	Концентрація в комбінованих середовищах 1,2-ПД:ПВС, %	Поверхневий натяг, мдж/м ²
1	0,05	52,28
2	0,07	51,86
3	0,10	51,13
4	0,15	51,16
5	0,25	50,40
6	2,50	49,66

На **рисунку** побудована ізотерма поверхневого натягу розчинів комбінованого середовища з вмістом 1,2-ПД та ПВС молекулярної маси 9 кДа. В області низьких концентрацій спостерігається криволінійна ділянка, яка на перетині з прямою утворює ККМ₁ ($\lg 0,60$) і дорівнює значенню 0,25% та описує властивості системи в молекулярному стані. Концентрація, при якій починаються зміни міцелярних властивостей, мають назву ККМ₂, що зв'язують з завершенням в цих розчинах сферичних міцел та має значення 2,5%. Показники поверхневого натягу різко зменшуються.

Гідрофобні ланцюги ПВС молекулярної маси 9 кДа забезпечують формування гідрофобних порожнин у структурі міцел [22], які здатні зменшувати рекристалізаційну активність, тому, припускаємо, комбіновані середовища мають активність інгібітора рекристалізації льоду.

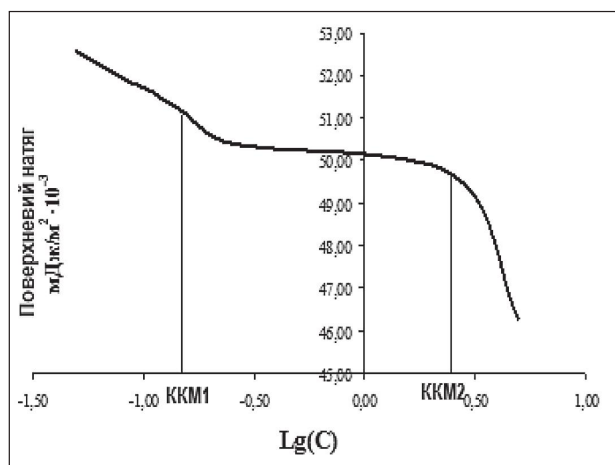


Рисунок – Залежність поверхневого натягу комбінованого середовища 1,2-ПД:ПВС м.м.9 кДа від логарифму концентрації розчинів.

Таблиця 3 – Показники стійкості еритроцитів людини в розчинах комбінованих середовищ 1,2-ПД+ПВС з м.м. 9 кДа після розморожування (M±m)

Розчини комбінованих середовищ,%	Гемоліз, %
20%1,2- PD	100±5
20%1,2PD +0,2% PVA	100±5
20%1,2- PD +1% PVA	97±3
30%1,2- PD	16±1,1
30%1,2PD +0,2% PVA	11±0,9
30%1,2 PD +1% PVA	22±1,8
40%1,2- PD	70±1,6
40%1,2- PD +1% PVA	85±3,4
40%1,2PD +0,2% PVA	80±2,5

Нашою метою було вивчення впливу розчинів полівінілового спирту м.м. 9 кДа (0, 2% та 1%) при додаванні до 20%, 30%, 40% розчинів кріопротектору 1,2-ПД на кріозахисну дію отриманих комбінованих середовищ. В якості гідрофільної сполуки особливої уваги заслуговує полівініловий спирт, який має достатньо велику кількість гідроксильних груп. Ймовірно, що завдяки такій структурі ця речовина може володіти кріопротекторними властивостями і надавати захисну дію на клітини при заморожуванні. У дослідженнях [6], була показана можливість підвищення життєздатності кріоконсервованих еритроцитів вівці та людини, мезенхімальних клітин і спермій. Були проведені експерименти по заморожуванню еритроцитів донорської крові людини зі швидкістю 3°C/хв. Контролем були еритроцити, які були заморожені в 20%, 30%, 40% розчинах 1,2-ПД.

Спостерігалось, що заморожування еритроцитів зі швидкістю 3°C/хв. у комбінованих розчинах, які містять 20% 1,2-ПД, 20% 1,2-ПД +0,2% ПВС, 20% 1,2-ПД +1% ПВС, призводить до майже повної загибелі еритроцитів після розморожування (таблиця 3). При заморожуванні клітин у 40% 1,2-ПД, а також у середовищах 40% 1,2-ПД+0,2% ПВС, 40% 1,2-ПД+1% ПВС кількість збережених клітин була вище, ніж у розчинах на основі 20% 1,2-ПД, але більше 50% еритроцитів після розморожування були гемолізовані, що свідчить про низьку кріозахисну активність цих розчинів. Комбіновані середовища з вмістом 1,2-ПД та ПВС мають здібність до міцелоутворення в рідкій фазі та визначаються критичною концентрацією міцелоутворення (ККМ). Встановлено, що при значенні ККМ кріозахисного середовища 0,25% властивості системи описуються в молекулярному стані. При концентрації (ККМ 2,5%) починаються зміни міцелярних властивостей та утворення сферичних міцел [10]. Міцелярні фракції при заморожуванні еритроцитів порушують цілісність мембрани, збільшується проникність мембран для води, що наводить до осмотичному шоку мембранних систем та до повної або часткової загибелі [14].

Найбільша збереженість еритроцитів, які були заморожені зі швидкістю 3°C/хв., отримана в наступних комбінованих розчинах: 30% 1,2-ПД+0,2% ПВС та 30% 1,2-ПД+1% ПВС. Виявлено, що комбінований розчин який містить 30% 1,2-ПД та 0,2% ПВС дозволяє значно знизити гемоліз еритроцитів після відігрівання у порівнянні з 30% розчином 1,2-ПД. Значення гемолізу

еритроцитів під час процедури видалення 1,2-ПД з клітин із використанням сахарозно-сольових розчинів наведено у таблиці 3 та дорівнює 11%. Ефективність амфільної сполуки 1,2-ПД, ймовірно, обумовлена особливостями фізико-хімічних властивостей 1,2-ПД (поверхневого натягу, динамічної в'язкості, від співвідношення ПВС та 1,2-ПД, концентрації сполук у комбінованих середовищах, швидкості заморожування, які використовували (табл. 1). Можливо, будова 1,2-ПД дозволяє успішно запобігти мембранним дефектам, так як сполука вбудовується у білого-ліпідний шар клітинної мембрани еритроцитів. Співвідношення у комбінованому середовищі 30% 1,2-ПД + 0,2% ПВС є оптимальним для збереження еритроцитів після заморожування. Комбінування у кріозахисному середовищі 30% 1,2-ПД та 1% ПВС (рівень гемолізу еритроцитів має значення 22%), навпаки, призвело до збільшення кількості гемолізованих клітин у порівнянні з 30% 1,2-ПД і розчином комбінованого середовища 30% 1,2-ПД+0,2% ПВС.

Показано, що найбільш високою кріопротекторною активністю при заморожуванні еритроцитів зі швидкістю 3°C/хв., володіє розчин комбінованого середовища який містить 30% 1,2-ПД+0,2% ПВС. Комбіноване середовище дозволяє зберегти 89% еритроцитів, є нетоксичним для еритроцитів людини і проявляє кріозахисну активність при повільному охолодженні клітин.

Аналіз отриманих результатів свідчить про важливе значення режиму і методу заморожування еритроцитів за умови використання у якості кріопротектора 1,2-ПД, і про необхідність проведення подальших досліджень ефективності комбінованих середовищ (1,2-ПД+ПВС) при різних програмах і методах охолодження.

Висновки.

Досліджена кріозахисна дія на основі поєднання проникаючого кріопротектору 1,2-пропандіолу з полівініловим спиртом м.м. 9 кДа на збереженість еритроцитів донорської крові людини. Застосування 1,2-ПД у комбінації з ПВС у концентрації 0,2% дозволило зменшити пошкодження розморожених клітин на етапі відмивання.

Високою кріопротекторною активністю при заморожуванні еритроцитів зі швидкістю 3°C/хв., володіє розчин комбінованого середовища, який містить 30% 1,2-ПД+0,2% ПВС.

Зі збільшенням концентрації розчинів 1,2-ПД, ПВС у комбінованих середовищах, збільшується в'язкість та густина, це свідчить про збільшення гідрофільності досліджуваних розчинів. Припускаємо що, в комбінованих середовищах до складу яких входить 1,2-ПД+ПВС відбуваються структурні зміни при додаванні до ПВС розчинів 1,2-ПД зменшується гідрофобність ПВС, за рахунок наявності алкільних груп у розчинах 1,2-ПД.

Комбіновані середовища на основі поєднання 1,2-ПД та ПВС мають здібність до міцелоутворення в рідкій фазі. Комбіновані середовища з ПВС молекулярною масою 9 кДа здатні утворювати змішані міцели та відбувається адсорбція молекул ПВС на поверхні міцел, які забезпечують формування гідрофобних порожнин у структурі міцел та здатні зменшувати рекристалізаційну активність, тому, можемо

припустити, що комбіновані середовища мають властивість інгібітора рекристалізації.

Перспективи подальших досліджень.

На нашу думку, на сьогоднішній день перспективним є вивчення та проведення подальших досліджень, спрямованих на розробку нових кріозахисних

середовищ у поєднанні з полівініловим спиртом для заморожування еритроцитів, оптимізація етапів кріоконсервування клітин крові буде сприяти підвищенню ефективності і кріозбереження еритроцитів для практичного застосування.

References / Література

1. Brun, JF, Micallef JF, Supparo I, Rama D, Benezis S, Orsetti A. Maximal oxygen uptake and lactate thresholds during exercise are related to blood viscosity and erythrocyte aggregation in professional football players. Clin. Hemorheol. 1995;15:201-12.
2. Hvozdiuk YV, Pakhomova YS, Chekanova VV, Kompaniets AM. Kriozahisna diay kriokonservantiv na osnovi 1,2-PD ta polivinilovogo spirty (m. m. 9 kDa) pri povilnomu oholodzeni eritocitiv lydini. Tezice of the conference Scientific collection Interconf. 2021;48:783-85. Dostupno: <https://www.researchgate.net/profile/AleksanderHejna/publication/350876777>. [in Ukrainian].
3. Hvozdiuk YV, Chekanova VV, Pakhomova YS. Physicochemical properties and cryoprotective action of solutions of polyvinyl alcohol, glycerol and media based on their combinations during freezing of red blood cells. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2020;30(3):288. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo30.03a.288>.
4. Nicolenco AV, Vyazovskay OV, Chekanova VV. Isledovaniay krioprotektrornikh i fiziko-khimicheskikh svoistv sred na osnovi oksietilirovanogo metilicelozolva. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2012;22(3):252.
5. Dintenfass L. Clinical applications of hemorheology. Elsevier; 1981. Chapter, The Rheology of blood, blood vessels and associated tissues; p. 22.
6. Deller RC, Vatish M, Mitchell DA, Gibson MI. Synthetic polymers enable non-vitreous cellular cryopreservation by reducing ice crystal growth during thawing. Nature Communications. 2014;5:3244-51. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms4244>.
7. Gibson MI. Slowing the growth of ice with synthetic macromolecules: beyond antifreeze(glyco) proteins. Polym. Chem. 2010;1:1141-52. DOI: <https://doi.org/10.1039/C0PY00089B>.
8. Murata K, Tanaka H. Liquid-liquid transition without macroscopic phase separation in a water-glycerol mixture. Nat Mater. 2012;11(5):436-43.
9. Deller RC, Congdon T, Sahid MA, Morgan M, Vatish M, Mitchell DA, et al. Ice recrystallization inhibition by polyols comparison of molecular and macromolecular inhibitors and role of hydrophobic units. Biomaterials Science. 2013;1:478-85. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3BM00194F>.
10. Serdyuk AL, Kucher RV. Mitsellyarnye perekhody v rastvorakh poverkhnostno-aktivnykh veschestv. Kiev: Naukova Dumka, 1987. 202 s.
11. Holtcev AM, Grishenco VI, Novak VL, ta in. Metodichni rekomendacii Kriokonservuvannya klityn donorskoyi krovi ta yikh dovhostrokovye zberihannya u nizko-temperaturnykh bankakh. Kharkov: Style-Izdat; 2016. 34 s. [in Ukrainian].
12. Kompaniets AM, Chekanova VV, Nicolenco AV. Sintez, fiziko-khimicheskie svoistva oksietilinykh proizvodnykh. Kharkov; 2012. 26 s.
13. Dyubko T, Pivovarenko V, Chekanova V, Hvozdiuk Y, Pakhomova Y, Kompaniets A, et al. Study of aggregation of polyvinyl alcohols (9 and 31 kDa) in aqueous solution by fluorescence probing. Biophysical Bulletin. 2020;44:7-17. DOI: <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2020-44-01>.
14. Mittel K. Mitselobrazovaniya, solyubilizatsiya i mikroemu'sii. Mir; 1980. 597 s.
15. Hugginc CE. Prevention of hemolysis of large volumes of red blood cell slowly frozen and thawed in the presence of dimethylsulfoxide. Transfusion. 1963;3(1):483-93.
16. Chekanova VV, Pakhomova YuS, Kompaniets AM. Mitselobrazovanie v rastvorakh oksietilirovannykh glitserinoy i kobinirovannykh sredakh na ikh osnove. Visnik KhNMU. 2016;26(49):39-4.
17. Chekanova VV, Pakhomova YuS, Kompaniets AM, Kireev VA, Hvozdiuk YV. Phisiko-khimichni vlastivosti ta mitseloytvorennya rozchyniv polivinilovogo spirty riznykh molekulyarnykh mas. Ukrainian Bulletin medicine, biology and sports. 2021;6(2):241-48. [in Ukrainian].
18. Richards SJ, Jones MW, Hunaban M, Haddleton DM, Gibson MI. Probing bacterial-toxin inhibition with synthetic glycopolymers prepared by tandem post-polymerization modification: role of linker length and carbohydrate density. Angew. Chem. Int. Ed. 2012;51:7812-16. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.201202945>.
19. Xiangjian L, Haiyan P, Jingxian X, Yuying H, Fenglin L, Xueuing W, et al. Methods in biosynthesis and characterization of the antifreeze protein (AFP) for potential blood cryopreservation. Journal of Nanomaterials. 2021;2021:9932538. DOI: <https://doi.org/10.1155/2021/9932538>.
20. Hvozdiuk YV, Kompaniets AM. Doslidgenia y porivnyalnoy aspekti kriozakhisnoi dii kriokonservantiv na osnovi glicerinu v kombinacii z polivinilivim spirtom riznykh molekulyarnykh mas pri shvidkomy ta povilnomy oholodzeni donorskoi krovi lydini. Bulletin of problems of biology and medicine. 2022;2(1):164:89-9. DOI: <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2022-2-1-164-89-99>. [in Ukrainian].
21. Dyubko T, Pivovarenko V, Chekanova V, Hvozdiuk Y, Kompaniets A, Tatarets A. Study of interaction of glycerol cryoprotectant and its derivatives with dimethylacetamide in aqueous solution using fluorescent probes. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2021;31(2):139-50. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo.31.02.139>.
22. Congdon T, Notman R, Gibson MI. Antifreeze (glyco)protein mimetic behavior or poly(vinyl alcohol): detailed structure ice recrystallization inhibition activity study. Biomacromolecules. 2013;14:1578-86. DOI: <https://doi.org/10.1021/bm400217j>.
23. Vinogradov GV, Malkin AY. Reologia polimerov. M.: Himiy; 1977. 437 s.
24. Nicolenco AV, Vyazovskay OV, Chekanova VV. Zberezenist eritocitov lydini do i pislya zamoragiyvannya v kombinovanikh kriozahisnykh seredovishah. Physiological journal. 2014;60(3):201. [in Ukrainian].
25. Chekanova VV, Kompaniets AM, Pakhomova YS. Cryoprotective properties of solutions based on impermeable OEGn=25 in combination with penetrating cryoprotectants when freezing human erythrocytes. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2013;23(1):26-8
26. Nicolenco AV, Vyazovskay OV, Chekanova VV. Kriozashitnay effektivnost sred, soderzashikh kombinacii oksietilirovanogo metilicelozolva i diethylacetamida pri zamoragivani-otogreve eritocitov cheloveka. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2013;23(4):297-8.

ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ТА КРІОЗАХИСНА ДІЯ КОМБІНОВАНИХ СЕРЕДОВИЩ НА ОСНОВІ 1,2-ПРОПАНДІОЛУ В КОМБІНАЦІЇ З ПОЛІВІНІЛОВИМ СПИРТОМ МОЛЕКУЛЯРНОЇ МАСИ 9 КДА

Чеканова В. В., Гвоздюк Я. В., Пахомова Ю. С., Компанієць А. М.

Резюме. Пошук нових високоефективних кріозахисних середовищ для кріоконсервування донорської крові людини (зокрема еритроцитів) та підбір оптимальних температурних режимів для їх довготривалого зберігання, це одна з найголовніших сьогоднішніх задач. Вважалося, що за допомогою об'єднання кріопротекторів ендо- та екзоцелюлярної дії, можна вирішити проблему росту поза- та внутрішньо клітинних кристалів льоду при охолодженні.

Мета – дослідження фізико-хімічних властивостей та кріозахисної дії середовищ різного складу на основі комбінації ендоцелюлярного кріопротектору 1,2-пропандіолу з розчинами полівінілового спирту 9 кДа при заморожуванні еритроцитів.

Об'єкт і методи дослідження. Для дослідження використовували розчини 1,2-пропандіолу та полівінілового спирту. Розчини ПВС готували ваговим методом на основі 0,1 М фосфатно-сольового буферу (рН 7,4), розчини 1,2-ПД готували на основі 0,9 % NaCl, концентрацію розчинів виражали у масових відсотках (мас.%). Всі розчини використовували після 24-годинної витримки при температурі (20±2) °С.

Об'єктом дослідження був еритроконцентрат, отриманий з донорської крові людини групи А(II)⁺, заготовленої на гемоконсерванті «Глюгіцир», яка зберігалась не більше 48 годин при температурі (4±2)°С. Еритроконцентрат отримували методом центрифугування консервованої донорської крові при 1250 g протягом 25хв., показник гематокриту визначали за допомогою центрифуги СМ – 70 «ELMI», процент гемолізу еритроцитів в надосаді розраховували за стандартними формулами.

Розморожені еритроцити відмивали від комбінованих криозахисних розчинів методом трьох кратного серійного центрифугування з використанням стандартних сахарозно-сольових розчинів.

Для визначення фізико-хімічних властивостей – в'язкості використовували віскозиметр Оствальду, поверхневий натяг та міцелоутворення комбінованих розчинів визначали за допомогою сталагмометричного методу.

Результати. Після заморожування–відтавання еритроцитів у комбінованих середовищах на основі 1,2-ПД в комбінації з ПВС м.м. 9 кДа спостерігалось підвищення збереженості еритроцитів за результатами гемолізу, у порівнянні з дією монорозчинів 1,2-ПД. Високою кріопротекторною активністю при заморожуванні еритроцитів зі швидкістю 3°С/хв., володіє розчин комбінованого середовища, який містить 30% 1,2-ПД+0,2% ПВС. В'язкість і густина збільшуються з підвищенням концентрації 1,2-ПД, ПВС у комбінованих середовищах, це свідчить про збільшення гідрофільності досліджуваних розчинів. Припускаємо що, в комбінованих середовищах до складу яких входить 1,2-ПД+ПВС відбуваються структурні зміни при додаванні до ПВС розчинів 1,2-ПД зменшується гідрофобність ПВС, за рахунок наявності алкільних груп у розчинах 1,2-ПД.

Комбіновані середовища на основі поєднання 1,2-ПД та ПВС мають здібність до міцелоутворення в рідкій фазі. Комбіновані середовища з ПВС молекулярною масою 9 кДа здатні утворювати змішані міцели та відбувається адсорбція молекул ПВС на поверхні міцел, які забезпечують формування гідрофобних порожнин у структурі міцел та здатні зменшувати рекристалізаційну активність, тому, можемо припустити, що комбіновані середовища мають властивість інгібітора рекристалізації.

Ключові слова: еритроцити, гемоліз, гематокрит, гідрофільно-гідрофобні взаємодії, в'язкість, поверхневий натяг, 1,2-ПД, ПВС.

PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES AND CRYO PROTECTIVE EFFECT OF COMBINED ENVIRONMENTS BASED ON 1,2-PROPANEDIOL IN COMBINATION WITH POLYVINYL ALCOHOL MOLECULAR WEIGHTS 9 kDa

Chekanova V. V., Hvozdiuk Ya. V., Pakhomova Yu. S., Kompaniets A. M.

Abstract. The search for new, highly effective cryoprotective media for the cryopreservation of donated human blood (in particular, erythrocytes) and the selection of optimal temperature regimes for their long-term storage is one of today's most important tasks. It was assumed that it is possible to solve the problem of the growth of extra- and intra-cellular ice crystals during cooling by combining cryoprotectants of endo- and exocellular action.

The aim was to study the physicochemical properties and cryoprotective action of media of different composition based on the combination of the endocellular cryoprotectant 1,2-propanediol with 9 kDa polyvinyl alcohol solutions during erythrocyte freezing.

Object and research methods. Solutions of 1,2-propanediol polyvinyl alcohol were used for the study. PVA solutions were prepared by the weight method using 0.1 M phosphate-salt buffer (pH 7,4), and 1,2-PD solutions were prepared using 0.9% NaCl. The concentration of the solutions was expressed as mass percentages (wt%). All solutions were used after 24-hour exposure at a temperature of (20±2) °C.

The object of the study was erythrocyte concentrate obtained from human donor blood of group A(II)⁺ and prepared with the hemopreservative «Glyugitsir», which was stored for no more than 48 hours at a temperature of (4±2)°C. Erythrocyte concentrate was obtained by centrifugation of preserved donor blood at 1250 g for 25 minutes, the hematocrit index was determined using a СМ-70 «ELMI» centrifuge, and the percentage of hemolysis of erythrocytes in the supernatant was calculated according to standard formulas.

Thawed erythrocytes were washed from combined cryoprotectant solutions by threefold serial centrifugation using standard sucrose-salt solutions.

An Ostwald viscometer was used to determine the physicochemical properties – viscosity, and the surface tension and micelle formation of the combined solutions were determined using the stalagmometric method.

The results. After freezing-thawing of erythrocytes in combined media based on 1,2-PD in combination with PVA m.m. 9 kDa increased preservation of erythrocytes as a result of hemolysis, in comparison with the action of monosolutions of 1,2-PD. A solution of a combined media containing 30% 1,2-PD+0.2% PVA has high cryoprotective activity when freezing erythrocytes at a speed of 3°С/min. Viscosity and density growth with an increase in the concentration of 1,2-PD, PVA in combined media indicates an increase in the hydrophilicity of the studied solutions. We assume that, in combined environments that include 1,2-PD+PVA, structural changes occur when 1,2-PD solutions are added to PVA, and the hydrophobicity of PVA decreases due to the presence of alkyl groups in 1,2-PD solutions.

Combined media based on the combination of 1,2-PD and PVA can form micelles in the liquid phase. Increasing m.m. PVA 9 kDa in combined media to the formation of mixed micelles and the adsorption of PVA molecules on the surface of micelles. These ensure the formation of hydrophobic cavities in the structure of micelles and can

reduce recrystallization activity. Therefore, we can assume that combined media have the property of an inhibitor of recrystallization.

Key words: erythrocytes, hemolysis, hematocrit, hydrophilic-hydrophobic interactions, viscosity, surface tension, 1,2-PD, PVA.

ORCID and contributionship: / ORCID кожного автора та його внесок до статті:

Chekanova V. V.: <https://orcid.org/0000-0002-0585-2224>^{BDF}

Hvozdiuk Ya. V.: <https://orcid.org/0000-0001-9377-4678>^{BCDE}

Pakhomova Yu. S.: <https://orcid.org/0000-0003-2682-3796>^{ACDF}

Kompaniets A. M.: <https://orcid.org/0000-0002-0633-77937>^{EF}

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors of the article confirm that they have no conflict of interest. / Автори статті підтверджують відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Hvozdiuk Yana Vasylivna / Гвоздюк Яна Василівна

Institute of Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine / Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Ukraine, 61015, Kharkiv, 23 Pereyaslavka str. / Адреса: Україна, 61015. м. Харків, вул. Переяслівська 23

Tel.: +380976149752 / Тел.: +380976149752

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 / **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.

Received 20.03.2024 / Стаття надійшла 20.03.2024 року
Accepted 23.08.2024 / Стаття прийнята до друку 23.08.2024 року