



<https://doi.org/10.15407/cryo35.01.014>

УДК 612.111:678.744.7:547.422:57.086.14

О.І. Осецький, Ю.С. Пахомова*, В.В. Чеканова, Я.В. Гвоздюк

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

* Labcryoprot24@gmail.com

РОЛЬ ПОЛІВІНІЛОВОГО СПИРТУ В КРІОЗАХИСНИХ СЕРЕДОВИЩАХ: ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ТА ОБМЕЖЕНЬ ПРИ ЗАМОРОЖУВАННІ ЕРИТРОЦИТІВ

У роботі обґрунтовано доцільність і визначені особливості використання полівінілового спирту у складі багатоконпонентних середовищ на основі проникаючих кріопротекторів під час швидкого охолодження еритроцитів людини. Рекомендовано використовувати полівініловий спирт тільки у складі багатоконпонентних середовищ на основі проникаючих кріопротекторів, які мають низьку температуру склування $T_g = -100... -150^\circ\text{C}$ (гліцерин, 1,2-пропандіол). Проведено порівняльну оцінку кріозахисної дії комбінованих середовищ, які містять полівініловий спирт різних молекулярних мас у поєднанні з 20% гліцерином або 1,2-пропандіолом, при заморожуванні еритроцитів людини. На основі результату збереженості еритроцитів встановлено, що найбільш оптимальну кріозахисну дію з усіх досліджених комбінованих середовищ має розчин, який містить 20%-й гліцерин та 0,5%-й полівініловий спирт з молекулярною масою 9 кДа.

Ключові слова: еритроцити людини, полівініловий спирт, проникні кріопротектори, температура склування.

Однією з найважливіших задач сучасності є створення стратегічних запасів еритроцитів донорської крові шляхом низькотемпературного консервування. Кріоконсервування еритроцитів забезпечить їх довгострокове зберігання, інфекційну безпеку та безперебійне постачання до клінічних установ під час надзвичайних ситуацій.

Згідно з існуючим уявленням [30, 37, 38], під час кріоконсервування еритроцити піддаються механічним, осмотичним та біохімічним пошкодженням, які можуть суттєво вплинути на життєздатність розморожених клітин. Тому для захисту еритроцитів від дії негативних факторів, які виникають під час кріоконсервування, використовують кріопротектори. Їх роль полягає не тільки в зниженні температури фазового

переходу «вода-лід», а й у контролюванні маси льоду, що утворюється, морфологічної будови його кристалів, рекристалізації тощо.

На сьогодні єдиною речовиною, яка схвалена для клінічного заморожування еритроцитів людини, є проникаючий кріопротектор — гліцерин [18]. Однак для досягнення задовільної збереженості клітин його необхідно використовувати у концентрації від 30 до 57% залежно від способу охолодження [27, 33, 36]. Такі концентрації гліцерину здатні викликати внутрішньосудинний гемоліз еритроцитів, тому його обов'язково видаляють перед трансфузією. Це складна і тривала за часом процедура, яка ускладнює використання розморожених клітин, особливо під час надзвичайних ситуацій. Також для заморожування еритроцитів дос-

Цитування: Осецький О.І., Пахомова Ю.С., Чеканова В.В., Гвоздюк Я.В. Роль полівінілового спирту в кріозахисних середовищах: оцінка ефективності та обмежень при заморожуванні еритроцитів. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2025; 35(1): 14–22. <https://doi.org/10.15407/cryo35.01.014>

© Видавець ВД «Академперіодика» НАН України, 2024. Стаття опублікована на умовах відкритого доступу за ліцензією CC BY-NC-ND license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

лідники використовують ще один проникаючий кріопротектор — 1,2-пропандіол (1,2-ПД) [1]. Порівняно з гліцерином, 1,2-ПД швидше видаляється з клітин. Це обумовлено більш низькою молекулярною масою цієї речовини і високим коефіцієнтом проникності крізь мембрану еритроцитів [20]. Але ефективність 1,2-ПД проявляється за умов його використання у концентрації 37% та двоетапного охолодження еритроцитів [2].

У зв'язку з цим для підвищення ефективності протоколів кріоконсервування еритроцитів актуальним є пошук нових нетоксичних кріоконсервантів, які містять кріопротектори у невеликій концентрації, легко видаляються із клітин та не потребують складних методів охолодження.

Одним із відомих підходів до пошуку нових кріозахисних середовищ є використання комбінацій класичних кріопротекторів з речовинами, здатними проявляти кріозахисний ефект. Деякі дослідники вважають доцільним знизити концентрацію гліцерину за рахунок заміни його вуглеводами [24], антиоксидантами [5], амінокислотами [6, 15, 21, 25]. Також, як додатковий компонент, активно досліджують синтетичний водорозчинний полімер — полівініловий спирт (ПВС) [26, 32, 34, 35]. Інтерес до цієї речовини обумовлений тим, що молекула ПВС характеризується низькою токсичністю [10, 14], високою біосумісністю [12], здатністю проявляти кріозахисний ефект у мікромольній концентрації під час заморожування різних біологічних об'єктів та деяких протеїнів [28]. Так, R. Deller [13] повідомив, що додавання 0,5 – 5 мг/мл ПВС 9 кДа до еритроцитів, які заморожувались у розчині гідроксиетилкрохмалю, значно підвищує їх збереженість. Принцип кріозахисної дії ПВС пояснюють його здатністю інгібувати рекристалізацію льоду під час розморожування клітин [9, 16, 18, 22, 23]. Дійсно, в модельних експериментах було показано, що молекула ПВС ефективно пригнічує рекристалізацію льоду в діапазоні концентрацій від 0,05 до 1 мг/мл [11]. Однак цей механізм захисту біологічних об'єктів під час заморожування є предметом дискусій. Так, у деяких роботах [17, 29] виявлено, що 1 мг/мл ПВС, навпаки, здатний ініціювати гетерогенну нуклеацію льоду. Здатність ПВС до ініціювання кристалізації визначається його молекулярною

масою, а також концентрацією. У зв'язку з цим пошук оптимальних кріозахисних середовищ для кріоконсервування біологічних об'єктів, які містять ПВС, є складною задачею.

У роботі проаналізовано можливість ефективного використання ПВС у складі комбінованих кріозахисних середовищ і досліджено їх як потенційних заміників проникаючих кріопротекторів (гліцерину, 1,2-ПД) при заморожуванні еритроцитів людини.

Мета роботи — аналіз особливості використання полівінілового спирту різних молекулярних мас у складі середовищ зі зниженою концентрацією гліцерину або 1,2-ПД та дослідження їх кріозахисної дії під час швидкого охолодження еритроцитів людини.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Матеріалом дослідження був еритроконцентрат, отриманий з чоловічої донорської крові групи А (II). Донорська кров була заготовлена на гемоконсерванті «ЦФДА» у Харківському обласному центрі крові і зберігалась не більше 48 годин за температури $4 \pm 2^\circ\text{C}$. Еритроконцентрат отримували центрифугуванням консервованої донорської крові при 2500 об/хв протягом 20 хв.

Для експериментальних досліджень кріозахисні середовища готували на основі фосфатно-сольового буфера (0,9 ммоль/л Na_2HPO_4 , 0,13 ммоль/л NaH_2PO_4 , 150 ммоль/л NaCl , рН 7,4) і використовували після 24-годинної витримки за температури $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Кріозахисні розчини готували в масо-об'ємних концентраціях.

Як кріозахисні речовини використали гліцерин (Sigma-Aldrich, Німеччина), 1,2-ПД (Sigma-Aldrich) та ПВС з молекулярною масою 9 та 31 кДа (ПВС 9 кДа, ПВС 31 кДа) і ступенем гідролізу 88% (Sigma-Aldrich). У складі багатокомпонентних кріозахисних середовищ використовували 20%-й гліцерин або 1,2-ПД у комбінації з 0,1 та 0,5% ПВС 9 або 31 кДа. Контролем були еритроцити, які кріоконсервували під захистом 20%-го гліцерину або 1,2-ПД. Час експозиції еритроцитів у кріозахисних розчинах складав 15 хв при 20°C . Співвідношення об'ємів еритромаси і кріозахисних розчинів складало 1:1. Об'єм замороженої клітинної суспензії — 1,8 мл. Досліджені зразки заморожували в поліетиленових ампулах «Nunc» шляхом

занурення в рідкий азот ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) та зберігали від 1 до 3 тижнів. Зразки відігрівали у водяній ванні за температури $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ при постійному похитуванні ампул до появи рідкої фази.

Концентрацію вільного гемоглобіну в надосадовій рідині й загального гемоглобіну клітинної суспензії визначали гемоглобінціанідним методом за допомогою набору реактивів «Філіст-Діагностика» (Україна), показник гематокриту — центрифугуванням на центрифугі «СМ-70» при 7000 об/хв протягом 5 хв (Elmi, Латвія). Процент гемолізу еритроцитів розраховували за формулою:

$$\text{Гемоліз (\%)} = \frac{Hb_{free} \times 100 \times (1 - Ht)}{Hb}$$

де Hb_v — концентрація вільного гемоглобіну в надосадовій рідині, г/л; Hb — концентрація загального гемоглобіну клітинної суспензії, г/л; Ht — гематокрит, %.

Кількість збережених клітин (%) виражали за формулою:

Збереженість еритроцитів = $100\% - \text{Гемоліз (\%)}$.

Методом термопластичної деформації досліджували водні розчини гліцерину, 1,2-ПД та їх комбінації з ПВС 9 кДа. Зразки охолоджували зі швидкістю $4\text{ }^{\circ}\text{C/хв}$ до $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$, стабілізували протягом 10 хв за кінцевої температури. Для визначення температур розкльовання T_g водних розчинів кріопротекторів до досліджуваних зразків прикладали зсувне деформувальне

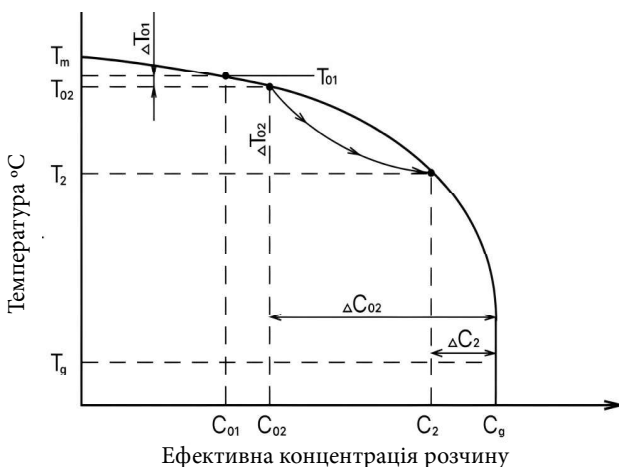


Рис. 1. Діаграма стану позаклітинного розчину в присутності кріопротекторів

напруження $\sigma = 4 \times 10^5\text{ кг / м}^2$ [31]. Реєстрацію термопластичних кривих зразків проводили при нагріванні зі сталою швидкістю 1 град/хв .

Статистичний аналіз експериментальних даних проводили за допомогою програмного забезпечення «Excel» (Microsoft, США). Експериментальні дані оцінювали з використанням критерій Манна-Уїтні та виражали у вигляді медіани та процентиля. Значущими відмінними вважали результати за рівня значущості $p \leq 0.01$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Одними з головних чинників, які впливають на збереження клітин під час кріоконсервування, є маса льоду, яка виникає всередині клітин під час охолодження, та зміна їхнього об'єму внаслідок перепадів осмотичного тиску між цитоплазмою і позаклітинним середовищем [3]. Ці зміни протікають в інтервалі температур $-10\text{...}-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, який відповідає різкому зниженню пластичності мембран клітин. Саме тому зміна об'єму клітин вище за деякі критичні значення призводить до незворотних порушень проникності їх мембран. Водночас згідно з наявними експериментальними даними [3] часткове зневоднення клітин можна ефективно використовувати для оптимізації технологій кріоконсервування. Цьому сприяє той факт, що пошкодження клітин під час стиснення (зменшення об'єму) менше, ніж під час розтягування (збільшення об'єму). Отже, для реалізації процесу часткового зневоднення клітин необхідно, щоб під час їх охолодження позаклітинна кристалізація починалася якомога раніше внутрішньоклітинної, тобто досягалося максимальне переохолодження цитоплазми.

За такої умови можливо ініціювати зневоднення клітин, яке контролюється швидкістю охолодження і коефіцієнтом проникності мембран для молекул води. Особливе значення це явище має під час використання проникаючих кріопротекторів. У цьому разі часткове зневоднення клітини призводить до підвищення ефективної концентрації кріопротектора в цитоплазмі та різкого зниження як температури переходу вільної води, що залишається, у лід, так і маси льоду, що утворюється всередині клітини. Термодинамічна схема цього процесу представлена на рис. 1.

Згідно з рис. 1, відмінності ефективних концентрацій позаклітинного середовища C_{01} і цитоплазми C_{02} забезпечує відносне переохолодження цитоплазми на величину ΔT_{01} . Це призводить до того, що під час охолодження клітинної суспензії утворення кристалів льоду починається в позаклітинному середовищі за температури T_{01} . При цьому виникає порушення осмотичної рівноваги, і як наслідок, починається вихід води з клітин та подальше підвищення ефективної концентрації речовин у цитоплазмі від значення C_{02} до C_2 . Відповідно знижується температура внутрішньоклітинної кристалізації, як це показано на рис. 1. Зниження температури кристалізації цитоплазми до значень T_2 призводить до суттєвого зменшення маси внутрішньоклітинного льоду на величину:

$$\Delta m = K_1 \Delta C_{02} - K_2 \Delta C_2, \quad (1)$$

де K_1, K_2 — коефіцієнти пропорційні довжині канод, які проведені на діаграмі стану за температур T_2 і T_{02} , відповідно [8].

Саме з цієї причини процес зневоднення клітин підвищує їх збереженість під час кріоконсервування. Слід відзначити, що реалізувати наведений схематично процес на етапах кріоконсервування, особливо в присутності кріозахисних речовин, дуже важко. Навіть за використання проникаючих кріопротекторів, які характеризуються високою здатністю проникати крізь мембрану клітин, їх позаклітинна концентрація буде вищою, ніж внутрішньоклітинна. Це повністю нівелює ефект різниці концентрацій C_{01} і C_{02} та потребує особливих підходів для ініціювання внутрішньоклітинної кристалізації.

Результати аналізу свідчать, що з метою підвищення збереженості клітин під час кріоконсервування необхідно використовувати речовини, які здатні ініціювати позаклітинну кристалізацію. Згідно з експериментальними даними S. Ogawa та співавт. [29], такою речовиною може бути ПВС. Непроникні у клітину молекули ПВС адсорбують молекули води, які знаходяться у позаклітинному середовищі. За рахунок цього уповільнюється кінетичний рух молекул води, а їх локальна концентрація підвищується поблизу окремих фрагментів молекули ПВС. Це прискорює процес утворен-

ня зародків льоду. Фактично ПВС виступає як катализатор кристалізації, забезпечуючи осмотичне зневоднення клітин при достатньо високих швидкостях охолодження. Разом з тим водні розчини ПВС переходять у твердий стан при достатньо високих температурах ($-20 \dots -25^\circ\text{C}$), що різко підвищує ймовірність механічних пошкоджень кріоконсервованих клітин за рахунок пластичної релаксації термопружних напружень.

Амплітуди внутрішніх термопружних напружень 1-го роду σ_1 , які пов'язані з градієнтами температур у твердофазному зразку, що охолоджується (нагрівається), оцінюються за допомогою формули:

$$\Delta \sigma_1 = \langle \alpha \rangle E \cdot l_1 \partial T / \partial l, \quad (2)$$

де $\langle \alpha \rangle$ — середній коефіцієнт теплового лінійного розширення твердофазної матриці, що створилася нижче температури T_g ; E — ефективний модуль пружності цієї матриці; $\partial T / \partial l$ — градієнт температур, який з'являється у зразках, які охолоджуються (нагріваються) вздовж напрямків максимальної зміни температури.

Оскільки межа плинності льодяної матриці $\sigma_{пл}$, яка практично сходиться з її межею міцності, не перевищує значень $6 \cdot 10^6 \text{ Н/м}^2$, то можна оцінити допустимі градієнти температур під час розробки режимів охолодження-нагріву нижче температури T_g . Згідно з умовою (2) маємо:

$$\partial T / \partial l \leq \sigma_{пл} / \langle \alpha \rangle \cdot E \cdot l_1, \quad (3)$$

При характерних значеннях величин, що входять в умову (3), $\langle \alpha \rangle = 5 \cdot 10^{-5} \text{ град}^{-1}$; $E = 1011 \text{ Н/м}^2$; $l_1 = 10^{-2} \text{ м}$, маємо:

$$\partial T / \partial l \leq 10^2 \text{ град/м} \quad (4)$$

Якщо умова 4 не виконується, то у зразку неминуче виникають процеси пластичної релаксації напружень σ_1 , які призводять до суттєвих пластичних зсувів у льодяній матриці і утворенню тріщин в аморфних фракціях. Внаслідок цих процесів утворюються механічні пошкодження біооб'єктів, що кріоконсервуються. Зокрема, для уникнення цих пошкоджень необхідно використовувати холдери

різноманітних конструкцій. За їх допомогою можна досягнути виконання умови (4).

Разом з тим складніша проблема з'являється під час зменшення пошкодження об'єктів, що кріоконсервуються, за рахунок термопружних напружень 2-го роду σ_2 . Величину цих напружень можна оцінити за допомогою виразу:

$$\sigma_2 = E (\alpha_{\max} - \alpha_{\min}) \Delta T_2, \quad (5)$$

де $\alpha_{\max} - \alpha_{\min} = \Delta\alpha$ — різниця між коефіцієнтами, що характеризують теплове лінійне розширення фракцій, які складають твердофазну матрицю охолодженого кріопротекторного розчину чи замороженої за його допомогою біосистеми в цілому. ΔT — зміна температури кріопротекторного розчину, що охолоджується (нагрівається) біосистеми, після їх переходу в твердофазний стан. Звичайно величина ΔT визначається різницею між температурою склювання T_g кріопротекторного розчину і температурою кипіння рідкого азоту $T_N = -196^\circ\text{C}$. Тут необхідно відзначити, що максимальне значення $\Delta\alpha$ можуть досягатися не тільки між кристалічною та аморфною фракціями, але і між тепловим лінійним розширенням кристалів льоду різних кристалічних сумішей. Вираз (5) дозволяє визначити допустимі значення величини ΔT_2 як:

$$\Delta T_{\text{кр}} \leq \sigma_{\text{пл}} / E \Delta\alpha, \quad (6)$$

За умов використання характерних для льодової матриці значень величин, що входять у вираз (6), отримуємо $\Delta T \approx 10^\circ\text{C}$. При перевищенні цього значення в замороженій біосистемі будуть виникати термопружні напруження, які призведуть до пластичної релаксації і утворення тріщини, і як наслідок, — пошкодження цих біосистем.

Отже, використання ПВС у технологіях низькотемпературного кріоконсервування біологічних об'єктів можливо тільки у розчинах, які містять речовини з низькою температурою склювання T_g ($-100\dots -150^\circ\text{C}$): гліцерин та 1,2-пропандіол. При цьому важливе значення має вибір оптимальних концентрацій цих речовин. Фактично в інтервалі температур $T_m > T > T_g$ кріопротекторні речовини повинні забезпечувати структурні композиції, схема яких наведена на рис. 2. При цьому необхідна кон-

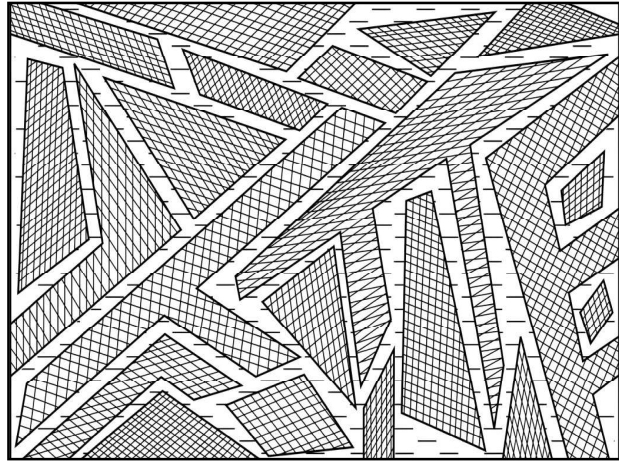


Рис. 2. Схема структури розчину, що охолоджується, в діапазоні температур $T_m > T > T_g$ та концентрацій кріопротекторів $10\% < C < 30\%$

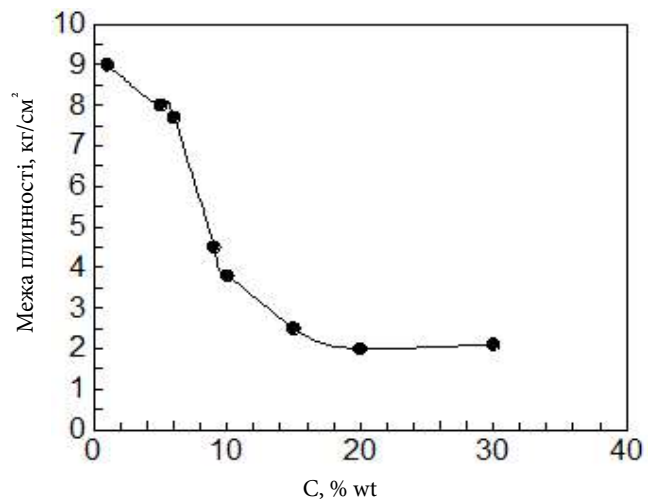


Рис. 3. Залежність межі плинності опл заморожених водних розчинів гліцерину від концентрації

центрація цих речовин має становити від 5 до 20%. Визначення цих концентрацій зручно здійснювати за допомогою вивчення пластичних характеристик заморожених кріопротекторних розчинів за методом описаним у А.І. Осецького та співавт. [4] (29). На рис. 3 наведена концентраційна залежність межі плинності водних розчинів гліцерину, отримана за температури $T_g < T = -70^\circ\text{C}$.

Згідно із залежністю $\sigma_{\text{пл}} = f(C)$ при значеннях $C > 7\%$ у зразках починають з'являтися міжзеренні рідкі включення, які знижують їх

ефективну площу: $S_{\text{eff}} = \frac{F_{\text{flu}}}{\sigma_{\text{flu}}}$, де F пл прикладене до зразка навантаження.

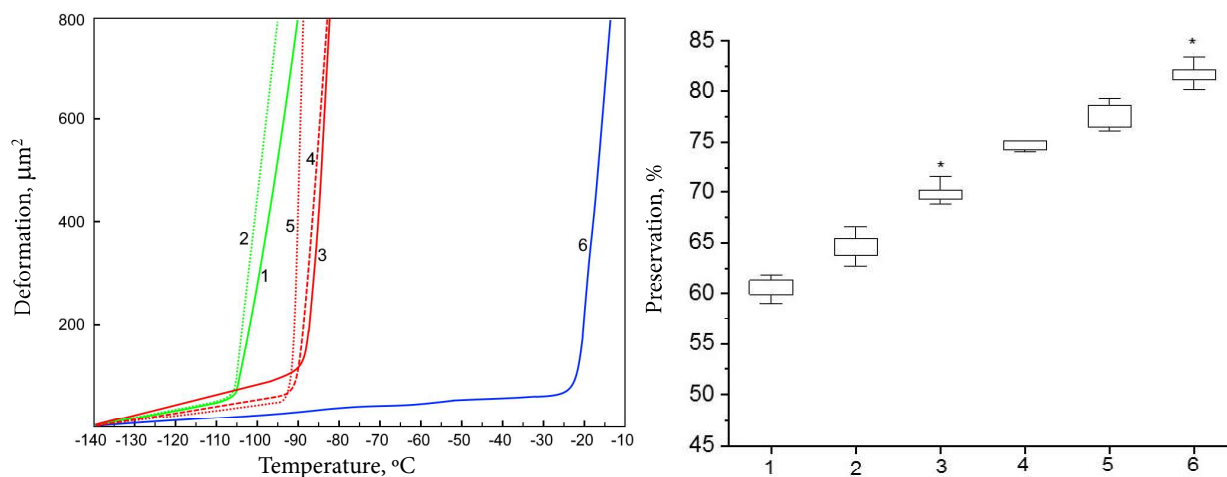


Рис. 4. Термопластичні криві заморожених водних криозахисних розчинів: 1 — 20% гліцерин; 2 — 20% гліцерин + 0,5% ПВС 9 кДа; 3 — 20% 1,2-ПД; 4 — 20% 1,2-ПД + 0,1% ПВС 9 кДа; 5 — 20% 1,2-ПД + 0,5% ПВС 9 кДа; 6 — 2% ПВС 9 кДа

Рис. 5. Збереженість еритроцитів людини після криоконсервування у розчинах на основі гліцерину та 1,2-пропандіолу, які містять ПВС 9 кДа. 1 — 20% 1,2-ПД, 2 — 20% 1,2-ПД + 0,1% ПВС 9 кДа, 3 — 20% 1,2-ПД + 0,5% ПВС 9 кДа, 4 — 20% Гліцерин, 5 — 20% Гліцерин + 0,1% ПВС 9 кДа, 6 — 20% Гліцерин + 0,5 % ПВС 9 кДа; * — різниця значуща порівняно з контролем, $p < 0.01$

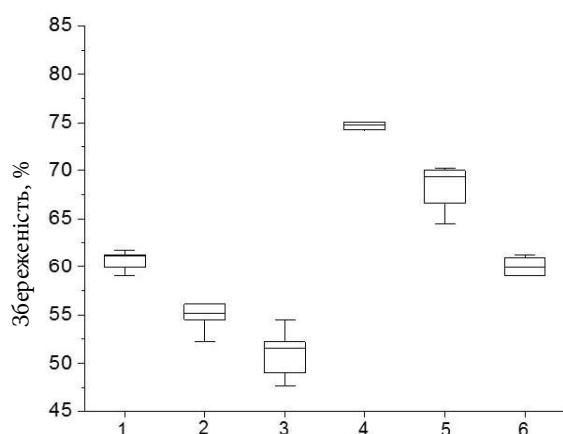


Рис. 6. Збереженість еритроцитів людини після криоконсервування у розчинах на основі гліцерину та 1,2-пропандіолу, які містять ПВС 31 кДа. 1 — 20% 1,2-ПД, 2 — 20% 1,2-ПД + 0,1% ПВС 9 кДа, 3 — 20% 1,2-ПД + 0,5% ПВС 9 кДа, 4 — 20% Гліцерин, 5 — 20% Гліцерин + 0,1% ПВС 9 кДа, 6 — 20% Гліцерин + 0,5 % ПВС 9 кДа; * — різниця значуща порівняно з контролем, $p < 0,01$

При значеннях $C > 20\%$ маси рідкої фази достатньо для утворення міжзеренних рідкофазних прошарків, як це показано на рис. 2. З цього моменту пластична течія зразка визначається змішуванням кристалів льоду один відносно одного за гідрофазними прошарками. Ці прошарки забезпечують релаксацію термпружних напружень I і II типів. Вони суттєво зменшують механічні пошкодження криоконсервованих

біооб'єктів. У свою чергу саме при $C > 20\%$ ці прошарки визначають температуру склування композицій «вода / гліцерин / ПВС» та «вода / 1,2-ПД / ПВС». Термопластичні криві (рис. 4) демонструють склування цих композицій.

Результати оцінки збереженості розморожених еритроцитів після криоконсервування у досліджених комбінованих розчинах представлені на рис. 5. Отримані дані свідчать, що використання 20%-го гліцерину або 1,2-ПД у комбінації з 01%-м ПВС 9 кДа не приводило до значущого підвищення збереженості розморожених еритроцитів відносно 20% розчинів гліцерину та 1,2-ПД. У випадку використання 0,5%-го ПВС 9 кДа із 20%-м гліцерином або 1,2-ПД збереженість клітин була значуще вищою ніж у 20%-му розчинах гліцерину та 1,2-ПД, однак несуттєво. При цьому збереженість еритроцитів після заморожування у розчинах, які містять комбінацію гліцерину із ПВС 9 кДа, була вищою ніж у комбінації із 1,2-ПД.

Застосування ПВС 31 кДа із 20%-м гліцерином або 1,2-ПД, навпаки, сприяло зниженню ступеня збереженості еритроцитів порівняно з контрольними розчинами (рис. 6). Так, під час підвищення концентрації ПВС 31 кДа у всіх досліджених криозахисних середовищах відмічена тенденція до зниження рівня збереженості клітин. Таким чином, було показано, що комбіновані криозахисні розчини на основі 20%-го

гліцерину або 1,2-ПД, які містять ПВС 31 кДа, є неефективними для криоконсервування еритроцитів.

За результатами порівняльної оцінки показника збереженості еритроцитів у досліджених криозахисних розчинах виявлено, що більш ефективно захищають еритроцити від криошкодження середовища, які містять комбінацію гліцерину та ПВС 9 кДа. Як видно на рис. 5, найвище значення збереженості еритроцитів було в зразках, криоконсервованих у 20%-му гліцерині з 0,5 % ПВС 9 кДа.

Результати наших досліджень показали, що використання ПВС у комбінованих криозахисних середовищах на основі гліцерину надавало синергетичний ефект під час криоконсервування еритроцитів. При цьому криозахисна дія ПВС визначалась його молекулярною масою та концентрацією у криозахисному середовищі. Так, ПВС 9 кДа, на відміну від ПВС 31 кДа, надавав більш виражену криозахисну дію — збільшився рівень збережених еритроцитів після криоконсервування. Низьку криозахисну дію ПВС 31 кДа можна пояснити тим, що зі збільшенням кількості ацетатних груп зростає здатність ПВС впливати на мембрани клітин, що може сприяти їх деформації та пошкодженню еритроцитів.

Також слід зазначити, що криозахисні розчини на основі гліцерину у комбінації з олігомерами ПВС виявляють кращу криозахисну дію порівняно з розчинами на основі 1,2-ПД. Ймовірно, це пов'язано із тим, що 1,2-ПД є менш ефективним криопротектором для ери-

троцитів людини під час їх швидкого охолодження у рідкому азоті [7].

ВИСНОВКИ

Отримані результати розширюють уявлення про особливості використання ПВС у складі багатокомпонентних криозахисних середовищ для заморожування еритроцитів людини. Основною перевагою використання ПВС, як криозахисної речовини у складі криозахисних середовищ, може бути його здатність до ініціювання кристалізації льоду. Завдяки цій властивості ПВС зростає ймовірність зниження маси внутрішньоклітинного льоду, що може сприяти підвищенню збереженості криоконсервованих клітин. Для розробки ефективного криозахисного середовища необхідно використовувати ПВС тільки у комбінації з речовинами, які мають низьку температуру склування T_g ($-100... -150^\circ\text{C}$) — гліцерин або 1,2-пропандіол. Це дозволить знизити можливі механічні пошкодження, які обумовлені саме впливом ПВС на кристалізацію. Так, використання 0,5%-го ПВС молекулярної маси 9 кДа у складі середовищ на основі 20%-го гліцерину або 1,2-пропандіолу приводило до підвищення збереженості еритроцитів після криоконсервування порівняно з монорозчинами цих криопротекторів. Найвищий показник збереженості розморожених еритроцитів був отриманий у середовищі, яке містило 20%-й гліцерин і 0,5%-й ПВС 9 кДа.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Alotaibi NAS, Slater NKS, Rahmoune H. Salidroside as a novel protective agent to improve red blood cell cryopreservation. PLoS One [Internet]. 2016 Sep 15 [cited 16.01.2024]; 11(9): e0162748. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0162748>
2. Bailey TL, Hernandez-Fernaund JR, Gibson MI. Proline pre-conditioning of cell monolayers increases post-thaw recovery and viability by distinct mechanisms to other osmolytes Trisha. RSC Med Chem. 2021; 12(6): 982–93.
3. Boutron P, Arnaud F. Comparison of the cryoprotection of red blood cells by 1,2-propanediol and glycerol. Cryobiology. 1984; 21(3): 348–58.
4. Cahn RW, Haasen P. Physical Metallurgy. Amsterdam: North-Holland Physics Publishing; 1996. 2740 p.
5. Capicciotti CJ, Kurach JDR, Turner TR, et al. Small Molecule Ice recrystallization inhibitors enable freezing of human red blood cells with reduced glycerol concentrations. Sci Rep [Internet]. 2015 Apr 8 [cited 16.08.2024]; 5:9692. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep09692>
6. Nair B. Final report on the safety assessment of polyvinyl alcohol. Int J Toxicol. 1998; 17(5): 67–92.
7. Congdon T, Notman R, Gibson MI. Antifreeze (glyco)protein mimetic behavior of poly(vinyl alcohol): detailed structure ice recrystallization inhibition activity study. Biomacromolecules. 2013; 14(5): 1578–86.

8. Dalyan O, Öztürk ÖF, Pişkin M. Toxicity of polyvinyl alcohols in medicinal chemist. MJEN. 2021; 9(2): 129–35.
9. Deller RC, Vatish M, Mitchell DA. Glycerol-free cryopreservation of red blood cells enabled by ice-recrystallization-inhibiting polymers. ACS Biomater Sci Eng. 2015; 1(9): 789–94.
10. DeMerlis CC, Schoneker DR. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). Food Chem Tox. 2003; 41(3): 319–26.
11. Dou M, Lu C, Sun Z, et al. Natural cryoprotectants combinations of l-proline and trehalose for red blood cells cryopreservation. Cryobiology. 2019; 91: 23–9.
12. Drori R, Li C, Hu C. A supramolecular ice growth inhibitor. J Am Chem Soc. 2016; 138(40): 13396–401.
13. Eickhoff L, Keßler M, Stubbs C, et al. Ice nucleation in aqueous solutions of short- and long-chain poly(vinyl alcohol) studied with a droplet microfluidics setup. J Chem Phys [Internet]. 2023 Apr 21 [cited 09.07.2023]; 158(15): 154504. Available from: <https://pubs.aip.org/aip/jcp/article-abstract/158/15/154504/2882248/Ice-nucleation-in-aqueous-solutions-of-short-and>
14. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 21st ed. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; 2023 [cited 12.08.2024]. Available from: https://www.avis.it/wp-content/uploads/2023/06/Blood_Guide_21st_edition.pdf
15. Gibson MI. Slowing the growth of ice with synthetic macromolecules: beyond antifreeze(glyco) proteins. Polym Chem [Internet]. 2010 May 26 [cited 01.04.2022]; 8(1): 1141–52. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2010/py/c0py00089b>
16. Gordiyenko EA, Pushkar NS. [Physical principles of low-temperature preservation of cell suspensions]. Kyiv: Naukova dumka; 1994. 143 p. Russian.
17. Gordiyenko OI, Linnik TP, Gordiyenko EO. Erythrocyte membrane permeability for a series of diols. Bioelectrochemistry. 2004; 62(2): 115–8.
18. Hu Y, Liu X, Ekpo MD, et al. Dimethylglycine can enhance the cryopreservation of red blood cells by reducing ice formation and oxidative damage. Int J Mol Sci [Internet]. 2023 Apr 3 [cited 15.08.2023]; 24(7): 6696. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/7/6696>
19. Inada T, Lu SS. Inhibition of recrystallization of ice grains by adsorption of poly(vinyl alcohol) onto ice surfaces. Crystal Growth & Design. 2003; 3(5): 747–52.
20. Inada T, Lu SS. Thermal hysteresis caused by non-equilibrium antifreeze activity of poly(vinyl alcohol). Chem Phys Lett. 2004; 394(4-6): 361–5.
21. Liu X, Hu Y, Pan Y. Exploring the application and mechanism of sodium hyaluronate in cryopreservation of red blood cells. Mater Today Bio [Internet]. 2021 Nov 10 [cited 08.12.2022]; 12: 100156. Available from: <https://europepmc.org/article/med/34825160>
22. Liu X, Hu Y, Zhang W, et al. Tricine as a novel cryoprotectant with osmotic regulation, ice recrystallization inhibition and antioxidant properties for cryopreservation of red blood cells. Int J Mol Sci [Internet]. 2022 Jul 30 [cited 08.06.2024]; 23(15): 8462. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/15/8462>
23. Marton HL, Styles KM, Kilbride P, et al. Polymer-mediated cryopreservation of bacteriophages. Biomacromolecules. 2021; 22(12): 5281–9.
24. Meryman HT, Hornblower M. A method for freezing and washing red blood cells using a high glycerol concentration. Transfusion. 1972; 12(3): 145–56.
25. Mitchell DE, Fayer AER, Deller RC, et al. Ice-recrystallization inhibiting polymers protect proteins against freeze-stress and enable glycerol-free cryostorage. Mater Horiz. 2019; 6(2): 364–8.
26. Ogawa S, Koga M, Osanai S. Anomalous ice nucleation behavior in aqueous polyvinyl alcohol solutions. Chem Phys Lett. 2009; 480(1-3): 86–9.
27. Osetsky AI, Kirilyk AL, Gurina TM. On possible mechanism of damage in frozen-thawed biological objects due to pressure plastic relaxation in closed liquid phase inclusions. Problems of Cryobiology. 2007; 17(3): 272–81.
28. Osetsky AI, Kirilyuk AL, Gurina TM. Study of devitrification kinetics of cryoprotectant aqueous solutions using thermoplastic deformation method. Problems of Cryobiology. 2005; 15(2): 137–46.
29. Osetsky AI, Kirilyuk AL, Gurina TM, Vysekantsev IP. Application of plastic strain method to determine threshold concentrations for cryoprotective substances during *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell cryopreservation. Problems of Cryobiology. 2007; 17(1): 71–9.
30. Pakhomov OV, Sidorenko OS. The impact of cryopreservation with polyvinyl alcohol on the survival and functional activity of rat testis interstitial cells. Biopolym Cell. 2021; 37(1): 14–22.
31. Rowe AW; Eyster E; Kellner A. Liquid nitrogen preservation of red blood cells for transfusion. Cryobiology. 1968; 5(2): 119–28.
32. Talha NAH, Jeon Y, Yu IJ. Cryopreservation of dog spermatozoa using essential and non-essential amino acids solutions in an egg yolk-free polyvinyl alcohol extender. Cryo Letters. 2021; 42(1): 44–52.

33. Tessier SN, Haque O, Pendexter CA, Cronin SEJ, et al. The role of antifreeze glycoprotein (AFGP) and polyvinyl alcohol/polyglycerol (X/Z-1000) as ice modulators during partial freezing of rat livers. *Front Phys* [Internet]. 2022 Dec 22 [cited 12.08.2024]; 10: 1033613. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/physics/articles/10.3389/fphy.2022.1033613/full>
34. Valeri CR, Ragno G, Pivacek LE, et al. An experiment with glycerol-frozen red blood cells stored at -80°C for up to 37 years. *Vox Sang*. 2000; 79(3): 168–74.
35. Vispute DM, Solanki PK, Rain Y. Large surface deformation due to thermomechanical effects during cryopreservation by vitrification – mathematical model and experimental validation. *PLoS One* [Internet]. 2023 Mar 9 [cited 08.12.2024]; 18(3): e0282613. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0282613>
36. Vorotilin AM, Guchok MM, Guchok VM, et al. [Comparative evaluation of erythrocyte cryopreservation under the protection of 1,2-propanediols (alpha-propylene glycol) and glycerin]. *Probl Gematol Pereliv Krovi*. 1982; (10): 15–9. Russian.
37. Vorotilin AM, Guchok VM, Kaleko SP, Petrenko GI. A new preparation propane diosaccharole as an effective cryopreservative for erythrocytes. In: *Current progress in cryobiology. II International Conference Abstracts, April 21-25, 1992, Kharkiv, Ukraine*. Kharkiv: 1992. P. 200.
38. Yang, J, Pan C, Zhang J, et al. Exploring the potential of biocompatible osmoprotectants as highly efficient cryoprotectants. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017; 9(49): 42516–24.

Received: 14.10.2024

Accepted for publication: 20.02.2025

O.I. Osetsky, Y.S. Pakhomova*, V.V. Chekanova, Y.V. Hvozdiuk

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

* Labcryoprot24@gmail.com

ROLE OF POLYVINYL ALCOHOL IN CRYOPROTECTIVE MEDIA: EVALUATING EFFICIENCY AND LIMITATIONS IN ERYTHROCYTE FREEZING

The paper substantiates the feasibility and determines the peculiarities of using polyvinyl alcohol in multicomponent media based on penetrating cryoprotectants during rapid cooling of human erythrocytes. Polyvinyl alcohol is recommended to be used only as a part of multicomponent media based on penetrating cryoprotectants with a low glass transition temperature $T_g = -100 \dots -150 \text{ }^\circ\text{C}$ (glycerol, 1,2-propanediol). A cryoprotective effect of combined media containing polyvinyl alcohol of different molecular weights in combination with 20 % glycerol or 1,2-propanediol during freezing of human erythrocytes was comparatively assessed. Based on the results of erythrocyte preservation, the solution containing 20 % glycerol and 0.5 % polyvinyl alcohol with a molecular weight of 9 kDa was found to have the most optimal cryoprotective effect of all the studied combined media.

Key words: human erythrocytes, polyvinyl alcohol, penetrating cryoprotectants, glass transition temperature.