

УДК 612.112.9.014.43

## ТОКСИЧНОСТЬ КРИОПРОТЕКТОРОВ И КРИОКОНСЕРВАНТОВ НА ИХ ОСНОВЕ ДЛЯ КОМПОНЕНТОВ КРОВИ И КОСТНОГО МОЗГА (ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ)

<sup>1</sup>Костяев А.А., <sup>2</sup>Мартусевич А.К., <sup>1</sup>Андреев А.А.

<sup>1</sup>ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови  
Федерального медико-биологического агентства», Киров, e-mail: niigpk@yandex.ru;

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО «Кировская государственная медицинская академия»  
Министерства здравоохранения РФ, Киров, e-mail: cryst-mart@yandex.ru

В работе рассмотрены физико-химические, биологические, токсико-фармакологические и криозащитные свойства известных криопротекторов – пропиленгликоля, глицерина, диметилсульфоксида, диметилацетамида, гексаметиленбистетрагидроксиэтилмочевины, полиэтиленоксида, поливинилпирролидона, гидроксиэтилкрахмала и других, гемоконсервантов на их основе для компонентов крови и костного мозга. Освещены некоторые аспекты механизма действия криопротекторов и предъявляемые к ним требования. Описано применение криопротекторов в эксперименте и практике низкотемпературного консервирования эритроцитов, гемопоэтических стволовых клеток и тромбоцитарных концентратов. Показан один из путей направленного раннего (на доклиническом уровне) выявления *in vitro* и предупреждения посттрансфузионных реакций и осложнений на клеточном и организменном уровне с использованием методов биокристалломики.

**Ключевые слова:** криопротекторы, криоконсерванты, криозащита, цитотоксичность, посттрансфузионные реакции, осложнения, биокристалломика

## TOXICITY OF CRYOPROTECTANTS AND CRYOCONSERVANTS ON THEIR BASIS FOR BLOOD COMPONENTS AND BONE MARROW (REVIEW ARTICLE)

<sup>1</sup>Kostyaev A.A., <sup>2</sup>Martusevich A.K., <sup>1</sup>Andreev A.A.

<sup>1</sup>Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical and Biological Agency, Kirov, e-mail: niigpk@yandex.ru;

<sup>2</sup>Kirov State Medical Academy of Health Care Ministry of Russian Federation, Kirov,  
e-mail: cryst-mart@yandex.ru

The paper discusses the physical and chemical, biological, toxicological, and pharmacological properties of known cryoprotectants – propylene glycol, glycerol, dimethylsulfoxide, dimethylacetamide, hexamethylenbis tetrahydroxyethylurea, polyethyleneoxide, polyvinylpyrrolidone, hydroxyethyl starch and other hemokonservants based on them for blood components and bone marrow. Some aspects of the mechanism of action of cryoprotectants and requirements to them are highlighted. The use of cryoprotectants in the experiment and practice of low temperature preservation of erythrocytes, the hematopoietic stem cells and platelet concentrates are described. One of the ways of directional early (at the preclinical level) *in vitro* detection and prevention of post-transfusion reactions and complications at the cellular and organismal level using biokristallomiki methods is shown.

**Keywords:** cryoprotectants, cryokonservanty, cryoprotection, cytotoxicity, post-transfusion reactions, complications, biokristallomika

Проблема сохранения в замороженном состоянии концентратов эритроцитов (КЭ), концентратов тромбоцитов (КТ), концентратов лейкоцитов (КЛ), гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) – компонентов донорской крови (КДК) и ядерных клеток костного мозга (ЯККМ) в течение срока, значительно превышающего продолжительность их физиологической жизни вне организма, остается одной из актуальных задач современного естествознания [6, 30, 60]. основоположником криобиологии и учения о криопротекторах – защитных веществах, способных предотвращать развитие терминальных криоповреждений в живых биосистемах на этапах их низкотемпературного консервирования, является Н.А. Максимов [40, 96]. Он первоначально обнаружил криозащитное свойство у многоатомного спирта глицери-

на [75]. В 1916 г. Фрэнсис Рус и Д.Р. Турнер (Цит. по В.А. Белобородову [49]) впервые доказали возможность сохранения крови в течение нескольких дней после донации при добавлении к ней глюкозо-цитратных консервирующих растворов. Первая трансфузия размороженных клеток крови с лечебной целью была осуществлена Моллисоном и Словитером в 1951 г. [106, 107].

В изучении вопросов адаптации клеточных суспензий к гипо- и анабиозу активно сотрудничают теоретики-экспериментаторы, химики, криофизиологи, криобиологи, криоинженеры, токсикологи, фармакологи, трансфузиологи и другие специалисты. В работах ученых показано, что криопротекторы уменьшают интенсивность адаптационного процесса, снижают уровень клеточного метаболизма, делающие клетки

менее восприимчивыми к криповреждениям [17, 30 – 32, 55].

Основная масса повреждений клеточных структур на этапах холодной адаптации-замораживания-отогревания КДК и ЯККМ связана с эффектами, вызванными обезвоживанием, образованием вне- и внутриклеточных кристаллов льда, а также токсичностью криопротекторов. К настоящему времени в качестве перспективных криопротекторов апробировано больше 120 веществ, принадлежащих к разным классам химических соединений. Это спирты (этиленгликоль,  $\alpha$ -пропиленгликоль, глицерин и др.), амиды (диметилацетамид, мочевины и др.), оксиды (диметилсульфоксид и др.), углеводы (глюкоза, сахароза и др.), искусственные полимеры (поливинилпирролидон, оксиэтилированный крахмал, полиэтиленгликоль, полиэтиленоксид и др.), неорганические соли (натрий хлорид и калий хлорид, кальций хлорид, натрий цитрат и натрий фосфат трехзамещенный, динатриевая соль ЭДТА и др. Приведенный список не исчерпывает ни классов химических соединений, в которых могут встретиться вещества, обладающие криопротекторными свойствами, ни перечень криопротекторов в названных классах [17, 60].

В изучении известных и синтезе новых криопротекторов и криоконсервантов на их основе очень важен выбор рабочей классификации разрабатываемых химических соединений. В историческом плане следует отметить J. Lovelock [92, 93], который одним из первых предложил различать криопротекторы по способности проникать через плазматическую мембрану клетки. Автор выделил эндоцеллюлярные криопротекторы, проникающие в клетки (КПК), и экзоцеллюлярные криопротекторы, непроникающие в клетки (КНК).

Н.С. Пушкарь и соавт. [55] добавили к двум названным третью группу – криопротекторы смешанного действия (КСД), проявляющих одновременно эффекты КПК и КНК.

Н. Maruman [94] уточнил, что эффектом КПК из низкомолекулярных обладают: глицерин, диметилсульфоксид (ДМСО), диметилацетамид (ДМАЦ),  $\alpha$ -пропиленгликоль (1,2-ПД), этиленгликоль (ЭГ) и др., у которых молекулярная масса (м.м.) до 101. Активными КНК являются вещества с м.м. выше 101: поливинилпирролидон (ПВП), гидроксизилкрахмал (ГЭК), полиэтиленгликоль (ПЭГ) и углеводы.

Эффективные КСД имеют м.м. 400 и выше. Это: полиэтиленоксид (ПЭО с м.м. 400), гексаметиленгидроксизилмочевина (ГМБТОЭМ) с м.м. 378) [80,

82], оксиэтилированный глицерин с м.м. до 1400 [8, 9]. ПЭО-400 имеет в составе мономерные фракции как эндо-, так и экзоцеллюлярного действия. Причем, основная масса полимера не проникает через плазматическую мембрану внутрь клетки [79].

В работах [17] подчеркнута зависимость сохранности клеток от скорости проникновения криопротектора внутрь биообъекта, молекулярной массы (чаще понижается с увеличением м.м.) и видовой принадлежности клеток.

Для систематизации имеющихся многокомпонентных хладоограждающих растворов, а также создающихся новых криофиллактов с реставрирующими добавками, Е.П. Сведенцов предложил оригинальную классификацию гемоконсервантов [60]. Эта классификация учитывает устоявшиеся названия криопротекторов и их свойства, которые были описаны и обоснованы Н.С. Пушкарь и соавт. [55], J. Lovelock [93], Н. Maruman [94] и другими исследователями, но отличается по характеру состава, количеству и, особенно, выделенными IV классами криоконсервантов:

I класс включает эндоцеллюлярные криоконсерванты; по числу криопротекторов в составе криоконсерванта: монокриоконсерванты – содержат по одному эндоцеллюлярному криопротектору и бикриоконсерванты – содержат по два эндоцеллюлярных криопротектора;

II класс образуют экзоцеллюлярные криоконсерванты; монокриоконсерванты – содержат по одному экзоцеллюлярному криопротектору; бикриоконсерванты – содержат по два экзоцеллюлярных криопротектора;

III класс образован криоконсервантами смешанного действия; монокриоконсерванты – содержат по одному криопротектору смешанного действия; бикриоконсерванты – содержат по два криопротектора смешанного действия;

IV класс включает комбинированные криоконсерванты, в т.ч.: бикомбинированные криоконсерванты эндо- и экзоцеллюлярного действия – содержат два криопротектора I и II классов; бикомбинированные криоконсерванты эндоцеллюлярного и смешанного действия – содержат два криопротектора I и III классов.

Во всех классах криоконсервантов могут быть использованы одна-две и больше «улучшающих» добавок.

Криопротекторы разной химической природы не имеют определенных границ по молекулярной массе и уровню токсичности (табл. 1). Как показали исследования, высокая хладоограждающая активность обнаруживается как у низкомолекулярных

(этиленгликоля с м.м. 62; ДМСО с м.м. 78,13; глицерина с м.м. 92,1), так и у высокомолекулярных химических веществ (ГЭК с м.м. 250 000–500 000, ПЭГ с м.м. 1500).

Токсичность криопротекторов характеризуется показателями их общей токсичности – токсичности на организменном уровне, и цитотоксичности – токсичности на клеточном уровне. Токсичность веществ оценивается среднелетальной дозой (ЛД<sub>50</sub>, г/кг), при введении которой погибает 50% подопытных животных [19]. Значительной токсичностью обладают «сильные» эндоцеллюлярные криопротекторы (КПК). В несколько раз меньше токсичность у КСД. Очень слабую токсичность проявляют КНК. Практика показывает, что методические приемы определения общей и цитотоксичности требуют совершенствования. В криобиологии принято сравнивать токсичность криопротекторов по выявленной ЛД<sub>50</sub> у белых лабораторных мышей [19, 60]. В исследованиях А.М. Компаниец и соавт. [27] показано, что токсичность КПК уменьшается с увеличением их молекулярной массы.

Теряя свойства КПК, химические соединения переходят в класс КНК. Так, например, происходит с производными глицерина монометилглицерином и диметилглицерином.

А.А. Цуцаева и соавт. [97], а также [16, 60] считают, что все криопротекторы, за исключением ПЭО-400–500 и ГМБТО-ЭМ-380, в зависимости от условий экспозиции в клеточной суспензии способны оказывать токсическое действие на организм и требуют удаления перед введением криоконсервированных клеток КДК в организм субъекта. Данная технология затратна, а также снижает морфологическую и биологическую полноценность трансфузионной среды.

Новым направлением в совершенствовании методов криоконсервирования КДК и ЯККМ стали исследования по пути создания многокомпонентных сред, в рецепты которых, наряду с криопротекторами, вводятся «реставрирующие» добавки: углеводы, белки плазмы, биологически активные соединения, соли и другие вещества с целью поддержания энергетического обмена в размороженных клетках, уменьшения токсичности, других побочных воздействий [8, 60, 75], а также содействию репаративным процессам в клеточной суспензии после замораживания-отогревания.

Благодаря успехам, достигнутым в исследовании механизмов криозащиты КДК и ЯККМ, получили развитие трансфузии размороженных аутологичных, сингенных

#### Свойства криопротекторов с выраженным хладоограждающим действием на КДК и ЯККМ

Криопротектор	М.м.	ЛД <sub>50</sub> , г/кг	Авторы	Компонент крови или ЯККМ
Этиленгликоль (КПК)	62	Низкая на клеточном и выраженная на организменном уровне	P. Bautron at al. [85]	КЭ
Пропиленгликоль или 1,2-ПД (КПК)	76,1	13,1	В.М. Гучок [23]	КЭ
Глицерин (КПК)	92,1	4,57±0,14	К.С. Anderson at al. [82]	КЭ, ГСК
ДМСО (КПК)	78,13	3,8±0,1	M.J. Ashwood-Smith [83]	КТ, КЛ ГСК
ДМАЦ (КПК)	87	4,2(2,5–3,9)	А.А. Цуцаева и соавт. [75]	КТ, КЛ, ГСК
Декстраны	40–60 тыс.		А.М. Белоус и соавт. [8]	КЭ и др.
Гидроксиэтилкрахмал (ГЭК)	60–120 тыс.		А.М. Белоус и соавт. [8]	КЭ, КЛ, ГСК
ПЭО-400 (КСД) ПЭО-1500	400	12,5	В.М. Гучок [21, 22, 23]	ГСК КЭ
Поливинилпирролидон (ПВП) Гемодез (КНК)	12–25 тыс. 12 тыс.		M.D. Persidsky [102] Г.Т. Черненко [77] С.С. Лаврик [34–38], П.М. Перехристенко и соавт. [51]	КЭ, ГСК
ГМБТОЭМ (КСД)	378	15,5±0,6	Е.П. Сведенцов [58, 60]	ГСК, КТ, КЛ

и аллогенных ГСК, КЭ и КТ [56, 57, 60] с лечебной целью. Наряду с положительными результатами трансфузий криоконсервированных КДК и ЯККМ, описаны случаи токсичного воздействия такого вида гемотерапии на организм реципиентов [10]. Накопленный научный и практический опыт по криоконсервированию КДК и ГСК показывает, что до настоящего времени остается открытым вопрос о поиске нетоксичного хладоограждающего вещества, не дающего опасных для здоровья реципиентов побочных эффектов [60, 75].

Вопрос о том, какими свойствами должен обладать эффективный криопротектор, до сих пор не имеет исчерпывающей оценки, хотя некоторые из этих свойств известны [17, 60]. В том числе:

- обладать способностью предупреждать развитие летальных криоповреждений форменных элементов, обеспечивать их сохранность в жизнеспособном состоянии после замораживания-отогревания и биологическую полноценность;

- быть нетоксичным, не требующим отмывания от размороженных клеток;

- хорошо растворяться в воде и стабилизировать молекулы воды;

- эффективно снижать количество вымораживаемой воды, способствовать образованию мелких кристаллов и стеклованию вне- и внутриклеточной воды;

- не откладываться (накапливаться) в клетках, тканях и органах макроорганизма;

- быстро выводиться из организма;

- не вызывать разрушения клеточных мембран и органелл;

- не приводить к развитию побочных эффектов: сенсibilизации, аллергии, гипертермии, не изменять функцию внутренних органов, эндокринной системы и репродуктивных органов;

- не должны иметь неприятного запаха, не вызывать рвоту, не приводить к диарее;

- участвовать в метаболических процессах жизнеспособных клеток макроорганизма.

Вещество, обладающее перечисленными свойствами, можно либо искать среди уже существующих криопротекторов, либо синтезировать первоначально, зная физико-химические особенности известных веществ [75]. Успех в целевых исследованиях может быть связан с представленным в данной работе материалом.

### Раздел 1. Криопротекторы и криоконсерванты первого класса

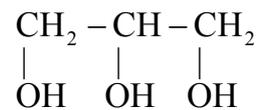
Образуют сильные криоконсерванты на базе КПК. Применяются для замораживания КЭ, КЛ, КТ, ГСК периферической, пуповинной крови или ЯККМ. Одним

из распространенных криопротекторов первого класса является глицерин.

#### 1.1. Краткие общие сведения о глицерине

Глицерин –  $C_3H_8O_3$  – трехатомный спирт, м.м. 92,10. Благодаря наличию ОН-групп, способен образовывать водородные связи с молекулами воды, растворяется в ней любых соотношениях. Глицерин растворяет соли и щелочи, мочевины, сахарозу и газы, а также растворяется в метиловом, этиловом и пропиловом спиртах.

Его структурная формула



Он тропен к клеткам и тканям организма животных. Участвует в энергетическом обмене. Относится к веществам с выраженной токсичностью. Его  $LD_{50}$  составляет  $4,57 \pm 0,14$  г/кг [82].

В качестве криопротектора используется глицерин (Glycerol) высшей степени (в/с) очистки или высшего сорта (ГОСТ 6259-75) с относительной плотностью 1,248. Утвержден Фармакологическим комитетом Минздрава и социального развития РФ для консервирования КДК и ЯККМ при температурах  $-10^\circ$ – $-196^\circ\text{C}$ . Криопротекторная активность глицерина высокая на различных биологических объектах.

#### 1.1.1. Моноэндоцеллюлярные криоконсерванты на основе глицерина

До настоящего времени криоконсерванты этого класса остаются лучшими для КЭ [60]. Для быстрого замораживания КЭ при  $-196^\circ\text{C}$  в жидком азоте разработан криоконсервант ЦНИИГПК 11<sub>4</sub>, в котором концентрация глицерина составляет 30%: Глицерин в/с, 300 мл; Маннит, 40 г; NaCl, 7 г или ЭДТА  $Na_2$ , 3 г;  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ , 0,3 г; Вода бидистиллированная – до 1000 мл; pH 5,6–6,2. Приготовленный раствор стерилизуют автоклавированием при 1,2 атм 30 мин. В стеклянных флаконах на 250 мл – 45 мин. Стерильный препарат хранят при комнатной температуре в темном помещении до 2 месяцев.

Криоконсервант добавляют к КЭ, помешивая в течение 5–8 мин в соотношении 1:1, суспензию оставляют при комнатной температуре на 15–20 мин для глицеринизации, затем переводят в криоконтейнер, герметизируют и погружают в жидкий азот на 2 мин [3, 19–21]. В жидком азоте хранят до 5 лет. Оттаивание суспензии производят в водяной ванне при  $+45^\circ\text{C}$  в течение 26 сек при ритмичном покачивании биоконтейнера

в режиме 200 качаний в минуту. Последующее отмывание глицерина от эритроцитов производят растворами хлорида натрия, маннита или сахарозы до нормотонической концентрации этих растворов. Затем эритроциты центрифугируют, осадок из красных кровяных телец ресуспандируют в плазмозамещающем растворе ЦОЛИПК № 8-в, переводят в полимерные контейнеры «Гемакон 300» или «Компопласт 300», герметизируют, паспортизируют и транспортируют в клинику. Для криоконсервирования эритроконцентратов в жидком азоте разработаны растворы ЦНИИГПК 11<sub>5-м</sub> и ЦНИИГПК<sub>5-с</sub>. Концентрация глицерина в них составляет 40%.

Состав криоконсерванта ЦНИИГПК 11<sub>5-м</sub>: Глицерин в/с, 400 мл; Маннит, 40 г; NaCl, 7 г; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•12H<sub>2</sub>O, 0,3 г; Вода бидистиллированная – до 1000 мл.

Состав криоконсерванта ЦНИИГПК 11<sub>5-с</sub>: Глицерин в/с, 400 мл; Сахароза, 50 г; NaCl, 7 г; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•12H<sub>2</sub>O, 0,3 г; Вода бидистиллированная – до 1000 мл.

Криоконсерванты медленно добавляют к КЭ в соотношении 1:1 при постоянном помешивании эритроцитов, затем центрифугируют при 1100 g 20 мин при +4°C, удаляют надосадочную жидкость, осадок перемешивают, переводят в криоконтейнер, герметизируют и замораживают в жидком азоте в течение 2–2,5 мин. Срок максимального хранения эритроцитов в замороженном виде составляет 5 лет, после чего КДК размораживают, взвешивают в растворе ЦОЛИПК № 8-в по стандартной технологии, переводят в полимерные контейнеры «Гемакон 300» или «Компопласт 300», герметизируют, паспортизируют и транспортируют в клинику.

Американской ассоциацией банков крови (аавВ) для консервирования КЭ замораживанием применяется глицерин в низкой (около 20%) или (в большинстве банков США) и высокой (около 40%) конечной концентрации [61]. Технология с низкой концентрацией глицерина позволяет использовать биохранилища с жидким азотом (–196°C), а с высокой конечной концентрацией криопротектора – электроморозильники на –80°C. Отмечен опыт успешного переливания размороженных эритроцитов, хранившихся 21 год при –196°C [98].

Для медленного замораживания КЭ с глицерином в воздушной камере электрического морозильника с температурой –60° ÷ –0°C Г.С. Воробьевой и Виноград-Финкель Ф.Р. [Цит. по Е.П. Сведенцову [60]] разработан криозащитный раствор, в состав которого входят: Глицерин в/с, 570 мл; Маннит, 20 г; Натрия хлорид, 4 г;

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•12H<sub>2</sub>O, 0,8 г; Вода для инъекций – до 1000 мл. Конечная концентрация глицерина в суспензии эритроцитов составляет 40%. Вся технология криоконсервирования и деглицеринизации эритроцитов растворами с понижающей концентрацией проводится в одном контейнере «Гемакон 500». КДК хранят полноценным при –80°C до 4 лет.

Высокая концентрация глицерина допускает глицеринизацию эритроцитов до 4 часов. Медленное замораживание клеток в электроморозильнике до –80°C допускает их длительное хранение при –65°C и последующее отмывание от протектора.

Для замораживания КЭ при –25°÷–38°C В.Н. Мельникова и соавт. [45, 46] разработан метод криоконсервирования КЭ под защитой ЦНИИГПК 11<sub>5-м</sub> или ЦНИИГПК 11<sub>5-с</sub>. Названные криоконсерванты смешивают с КЭ 1:1. Конечная концентрация глицерина составляет 20%. Используют электроморозильники на –25°C и –38°C, которые обеспечивают сохранность КДК, соответственно, от 5 до 12 мес. Перед трансфузией размороженные клеточные суспензии отмывают в 3 растворах хлорида натрия в убывающей концентрации 3,2; 2,0 и 0,9%.

Для замораживания и хранения эритроцитов с глицерином в электрическом морозильнике при –30°C применяют криоконсерванты ЦНИИГПК 11<sub>5-55</sub> и ЦНИИГПК 11<sub>с-5</sub> (Цит. по Е.П. Сведенцову [60]).

Состав ЦНИИГПК 11<sub>5-55</sub>: Глицерин в/с, 550 мл; Маннит, 40 г или Сахароза, 50 мл; Натрия хлорид, 7 г; Натрия фосфат двузамещенный, 0,3 г; Вода для инъекций – до 1000 мл; рН раствора 5,8–6,3 (с сахарозой).

Состав ЦНИИГПК 11<sub>с-5</sub>: Глицерин в/с, 400 мл; Маннит, 40 г или Сахароза, 50 мл; Натрия хлорид, 7 г; Натрия фосфат двузамещенный, 0,3 г; Вода для инъекций – до 1000 мл; рН раствора 6,0–6,75 (с Маннитом).

Отмеченные криоконсерванты смешивают в течение 10 мин с КЭ в пластиковом контейнере 1:1 или 1,6:1 и выдерживают при комнатной температуре в течение 15–20 мин. Конечная концентрация глицерина в суспензии составляет 24,6% и 27%, соответственно. Размораживают в водяной ванне при температуре +38°÷ +40°C в течение 10 мин. Деглицеринизацию осуществляют при трехкратном серийном центрифугировании суспензии с применением понижающих концентраций солевых растворов до нормотонии. Отмытые эритроциты взвешивают в растворе ЦОЛИПК № 8-в.

К настоящему времени созданы высокоэффективные «закрытые» автоматические технологии криоконсервирования и деглицеринизации эритроцитов, позволяющие

сохранять в жизнеспособном состоянии до 99 % красных кровяных телец.

### *1.1.2. Криоконсерванты на основе глицерина для замораживания ГСК*

Впервые низкотемпературное консервирование суспензии ЯККМ под защитой глицерина осуществили Barnes D. W., Loutit I. F. в 1955 году, применив двухэтапное замораживание (1 этап – до  $-15^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ; 2 этап – до  $-70^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ). Замороженные таким образом суспензии после отогрева и трансплантации смертельно облученным животным дали хорошие клинические результаты (Цит. по Е.П. Сведенцову [60]).

В нашей стране глицерин является разрешенным к применению криопротектором для ЯККМ. В сообщениях Федотенкова А.Г. и соавт. [68, 69] отмечается, что при криоконсервировании костного мозга в растворе ЦОЛИПК-1 с добавлением 20% раствора глицерина и катионной сыворотки сохраняется до 85% жизнеспособных клеток. Двухэтапное замораживание ГСК является наиболее щадящим режимом их низкотемпературного консервирования. Авторы сообщают о высокой лечебной эффективности миелоидной ткани, консервированной с 15% раствором глицерина у смертельно облученных собак.

Pegg D.E. [101], подводя итоги собственных исследований и обобщая данные литературы, делает вывод о сравнимой клинической эффективности трансплантаций свежезаготовленного (нативного) и криоконсервированного под защитой глицерина костного мозга. Автор рекомендует двухэтапные режимы замораживания, хранение костного мозга при  $-196^{\circ}\text{C}$  и медленное отогревание миелоидной ткани.

Холодный А.Я. и соавт. [73, 74] использовали трансфузии посмертного костного мозга, криоконсервированного под защитой 15% раствора глицерина, для купирования гипоплазии кроветворения после химиотерапии у больных раком шейки матки. Оттаянный костный мозг содержал 45–90% жизнеспособных клеток и оказывал положительный клинический эффект.

Глицерин, обладая высокой осмолярностью и низкой скоростью диффузии через цитоплазматическую мембрану, способен вызывать осмотический гемолиз клеток в момент введения их в сосудистое русло реципиента. Поэтому перед трансфузией требуется предварительно удалять криопротектор из костномозговой суспензии [70]. Вынужденная процедура приводит к снижению жизнеспособности и потере значительного количества ядерных клеток.

А.Г. Федотенков и соавт. [69] для замораживания ЯККМ (ГСК) предложили криоконсервант на основе 15% глицерина. Его состав: Глицерин в/с, 30 мл; Надосадочная жидкость, 50 мл; Сыворотка АВ (IV) группы крови, 20 мл.

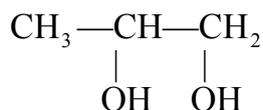
Миелоэксфузат стабилизируют на консервирующем растворе ЦОЛИПК № 3 с 10% раствором желатина в соотношении 1:3–1:4 (с учетом свертываемости биосреды). Под влиянием желатина в течение 30 мин происходит четкое разделение биосреды на два слоя. Надосадочный слой, обогащенный ЯККМ и ГСК, переводят в отдельный флакон, центрифугируют 15 мин со скоростью 1200 об/мин при  $+5^{\circ}\text{C}$ . Затем отделяют надосадок, обедненный ЯККМ и ГСК, для ретрансфузии пациенту. Оставшуюся во флаконе 100 мл биосреду, обогащенную ЯККМ и ГСК, тщательно ресуспендируют, после чего к ней медленно добавляют криоконсервант в соотношении 1:1. Приготовленную миеловзвесь с 15% глицерином выдерживают при комнатной температуре 30 мин (для глицеринизации ЯККМ), затем разливают в пластиковые криопакеты, герметизируют и переносят в электроморозильник на  $-20^{\circ}\text{C}$  на 25 мин до момента кристаллизации ( $-9^{\circ}\text{C}$ ). Затем биоконтейнер переносят в электроморозильник на  $-70^{\circ}\text{C}$ . Срок хранения ЯККМ и ГСК в этих условиях ограничен 2 мес. После размораживания суспензии в водяной ванне при  $+39^{\circ}\text{C}$ – $+40^{\circ}\text{C}$  насчитывается 76–92% эозинорезистентных ядерных клеток. Перед переливанием реципиенту клетки отмывают от глицерина растворами с понижающимися концентрациями глюкозы или сахарозы. Конечная концентрация глицерина в суспензии ЯККМ составляет 3,3%. Морфологическая сохранность и пролиферативная активность ГСК наиболее высоки через 10–15 мин после отогревания и деглицеринизации клеточной суспензии.

## **1.2. Моноэндоцеллюлярный криоконсервант «Пропандиосахароль» на основе пропиленгликоля для замораживания эритроцитов при $-196^{\circ}\text{C}$**

### *1.2.1. Краткие общие сведения о пропиленгликоле (1,2 ПД)*

Пропиленгликоль –  $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$  – двухатомный спирт алифатического ряда, м.м. 76,1, смешивается с водой в любых пропорциях, его эндоосмос в эритроциты проходит быстрее, чем у глицерина. Функциональные группы – «ОН» и «СН». ЛД<sub>50</sub> 1,2 ПД для кроликов составляет 13,1 г/кг массы, для крыс – 6 мл/кг. 1,2-ПД вызывает изменения на цитоплазматическом уровне [23].

Его структурная формула



Обладает криопротекторными свойствами в отношении различных клеток животных на более высоком уровне, чем глицерин и диметилсульфоксид [13, 14].

Состав криоконсерванта «Пропандиосахароль»: Пропиленгликоль (1,2-ПД), 370 мл; Сахароза, 32 г; Натрия хлорид, 6 г; Вода для инъекций – до 1000 мл; pH 5,5–7,5.

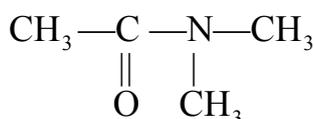
Выделенные эритроциты одномоментно смешивают с «Пропандиосахаролем» 1:1, центрифугируют, удаляют надосадочную жидкость, осадок – эритроцитную массу помещают в криopakет, замораживают со скоростью 12–14°C/мин до температуры хранения –196°C. После размораживания суспензии гемолиз клеток не превышает 2–3%. Пропиленгликоль от эритроцитов однократно отмывают 3% раствором сахарозы. Его остаточное количество в среде составляет 0,3–0,5%. Размороженные эритроциты хранят перед трансфузией в ресуспендирующем растворе ЦНИИГПК № 8 – в не более 24 ч. Апробация клинического применения эритроцитов, криоконсервированных с «Пропандиосахаролем», в Военномедицинской академии им. С.М.Кирова, ФГБУН КНИИ-ГиПК ФМБА России и Харьковской ОСПК выявила высокую физиологическую полноценность трансфузионной среды и эффективность избранной криотехнологии.

### 1.3. Моноэндоцеллюлярные криоконсерванты на основе диметилацетамида

#### 1.3.1. Краткие общие сведения о N, N-диметилацетамиде (ДМАЦ)

N, N-диметилацетамид (ДМАЦ) – химическая формула  $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)_2$ , м.м. – 73,10 [15]. Разрешен для клинического применения. Токсичность ДМАЦ изучена на различных животных: ЛД<sub>50</sub> для мышей составляет 4,2 г/кг (по другим данным 2,58–3,90 г/кг), для крыс – 3,56 г/кг (Цит. по А.А. Цуцаевой [25]). Обладает высокой криозащитной активностью в отношении КТ, КЛ и других клеток [27, 39, 64].

Его структурная формула



На основе ДМАЦ разработан гемоконсервант «Тромбокриодмац» (ТКД) для за-

мораживания тромбоцитов и метод длительного хранения КТ при  $0 \text{ } ^\circ\text{C}$   $\text{CH}_3 - 196^\circ\text{C}$  [3, 5].

Состав «Тромбокриодмац»: N, N-диметилацетамид (ДМАЦ), 50 мл; Глюкоза, 50 г; Вода для инъекций – до 1000 мл. pH 4,0–5,5.

Приготовленный гемоконсервант стерилизуют при 1,2 атм 30 мин. Хранят при комнатной температуре в закрытом от света месте в течение 2 лет. Замораживание КТ по линейной программе проводят со скоростью 3°C/мин до –60°C, далее переносят в жидкий азот (–196°C). После отогревания при +38°C по тестам *in vitro* сохраняется более 80% кровяных пластинок, из которых 50% имеют биологическую полноценность.

В 1985 г. разработан метод криоконсервирования КТ с раствором «Тромбокриодмац» (ТКД) при низких (–80°C) температурах в пластиковых контейнерах «Гемакон 300» или «Компопласт 300» в режиме быстрого двухступенчатого замораживания с использованием электрических морозильников на –30°C и –80°C. Первоначально контейнеры с КТ помещают в морозильную камеру с этиловым спиртом, охлажденным до –30°C. На втором этапе, после достижения КТ температуры –29°±30°C, биообъект переносят в хранилище на –80°C. Срок хранения 12 мес. Эффективность криоконсервирования КТ предложенным методом была подтверждена К.В. Кузнецовым и соавт. [33].

В ВМА им. С.М. Кирова Р.В. Тюриным [87] на основе ДМАЦ разработан криоконсервант для замораживания ЯККМ (ГСК) при –196°C.

Состав криоконсерванта: N, N-диметилацетамид (ДМАЦ), 24 мл; Глюкоза, 40 г; Трилон Б, 0,4 г; Вода для инъекций – до 1000 мл.

Перед началом криоконсервирования консервант разводят аутологичной плазмой 1:3. При использовании аллогенного костного мозга консервант разводят 1:3 сывороткой АВ(IV) группы. Затем его смешивают 1:1 с концентратом ЯККМ. Конечная концентрация ДМАЦ составляет 3%. Время экспозиции – не более 15 мин. Замораживают по программе: на первом этапе – 1°C/мин до начала кристаллизации, на втором – 5°–10°C/мин до –150°C, затем переносят в хранилище с жидким азотом (–196°C) на срок до 1,5 мес. В размороженных ЯККМ сохраняется до 90% колониеобразующих единиц грануломоноцитопоза (КОЕ-ГМ). ДМАЦ химически стоек, малотоксичен и лишен свойственного ДМСО неприятного запаха.

В ГНЦ РАМН [86] в 1977 году разработан криоконсервант на основе ДМАЦ для замораживания лейкоцитов – «Лейкокриодмац» [2, 4, 25].

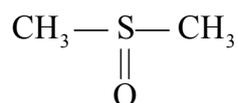
Состав гемоконсерванта «Лейкокриодмац»: N, N-диметилацетамид (ДМАЦ), 200 мл; Глюкоза, 20 г; Динатриевая соль ЭДТА, 4 г; Вода для инъекций – до 1000 мл. рН 4,5–5,5.

Стерилизуют автоклавированием при 1,2 атм 30 мин. Хранят в течение 2 лет. Смешивают с суспензией гранулоцитов 1:3, переводят в 100 мл пластикатные контейнеры, замораживают со скоростью 3°C/мин до –196°C. Срок хранения в жидком азоте не более 2 лет. Размораживают на водяной ванне при +39°C до температуры биопродукта 0°C÷+2°C. В нем сохраняются жизнеспособными до 78 % ядерных клеток.

#### 1.4. Моноэндоцеллюлярные криоконсерванты на основе диметилсульфоксида (ДМСО)

##### 1.4.1. Краткие общие сведения о диметилсульфоксиде

Диметилсульфоксид (ДМСО или  $\text{Me}_2\text{SO}$ ) –  $\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$ ; является органическим веществом, Его структурная формула



Относится к классу оксидов, его м.м.–78,13. ДМСО хорошо проникает в клетки, реорганизует структуру образующегося льда – происходит его мелкоячеистая кристаллизация, близкая по своей природе к аморфной [1, 28, 50, 72, 95, 108]. Силы взаимодействия между молекулами ДМСО и воды в 1,5 раза больше, чем между молекулами воды [55]. Установлено [24], что в системах, содержащих ДМСО, в отличие от систем с криопротекторами из класса полиолов, происходит кристаллизация эвтектических составов. Это явление, наряду с девитрификацией, представляет собой дополнительный криоповреждающий фактор. ДМСО обладает высокой способностью вступать в реакции с солями и оксидами фосфата, серы, формировать связи с глицерином, сахарозой, мочевиной, стеариновой кислотой и другими органическими соединениями. Известны противошоковое и антиоксидантное свойства ДМСО [76].

Впервые ДМСО в качестве криопротекторного средства предложили J. Lovelock и M. Bishop [93]. ДМСО был успешно испытан в клинике при криоконсервировании (–196°C) эритроцитов С.Е.Huggins [100] и лейкоцитов А. Rowe и Е. Cohen [105].

ДМСО является токсичным веществом [83, 89, 104] и обуславливает необходимость его отмывания после размораживания клеточной суспензии, что существенно усложняет процедуру получения качественных деконсер-

вированных клеток и приводит к потере части клеток в процессе отмывания. По данным Е.Е. Rosenbaum [104], токсичность ДМСО на организменном уровне имеет видовую зависимость.  $\text{LD}_{50}$  при внутривенном введении для кроликов, обезьян, лабораторных мышей и собак составляет соответственно: 19,2; 11,0; 3,8 и 2,5 г/кг веса. В последнее время для уменьшения токсичности ДМСО применяют более совершенные методы очистки вещества, а также используют в рецептах гемоконсервантов широкий спектр улучшающих «реставрирующих» добавок. Из последних методов стали использовать растворы декстрозы, полиглокина, ГЭК или ГМБТОЭМ.

Для консервирования КТ при –196°C ДМСО применяют в концентрации 5–11% [88]. При этом сохранность клеток составляет 30÷80%. Несмотря на то, что для снижения токсичности в раствор ДМСО вводилась гомологичная сыворотка, после замораживания-отогревания КТ находили снижение адгезивных свойств клеток, а у части кровяных пластинок – разрушения лизосом [99]. При переливании размороженных тромбоцитов, подвергнутых двукратному отмыванию, у 33% реципиентов наблюдали озноб и лихорадку. Неприятным свойством ДМСО является нестойкость этого соединения при хранении. ДМСО достаточно быстро распадается при комнатной температуре с образованием токсического вещества с резким неприятным запахом диметилсульфида ( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>S [71].

Для консервирования КЛ при –196°C ДМСО применяется в концентрации 6–15%, при этом лимфоциты переносят замораживание вполне удовлетворительно [105], а в ядрах и мембранах гранулоцитов исследователи обнаруживают сильные повреждения [87]. Применяется ДМСО и для криоконсервирования ЯККМ, ГСК периферической и кордовой крови [91]. В обзоре работ, представленных в монографии [54], отмечено, что растворы ДМСО с применением разных составов гемоконсерванта в 5–20% конечных концентрациях и разных программ замораживания-отогревания клеток обеспечивали сохранность до 80–90% жизнеспособных миелокариоцитов.

Ш.М. Багаутдинов [7] провел исследования по эффективности замораживания аутологичного костного мозга с 10% раствором ДМСО, который не подвергался высокой степени очистки. После 1,5 мес хранения ЯККМ в жидком азоте и отогревания пролиферативная активность клеток снижалась на 54% от исходного уровня. Автор объясняет полученные им результаты высокой цитотоксичностью ДМСО.

Конец XX и начало XXI столетий ознаменовались активным совершенствованием

методов получения и криоконсервирования ГСК. В 2003 г., согласно приказа Минздрава РФ № 325 «О развитии клеточных технологий», начали применять для клинических целей высокоочищенный ДМСО в криоконсерванте следующего состава: Высокоочищенный ДМСО 10%, 30 мл; Полиглюкин (м.м.– 60 000), до 300 мл. рН 4,5–6,5.

Раствор готовят непосредственно перед замораживанием ГСК. При соприкосновении с воздухом ДМСО окисляется и автоклавированию не подлежит: распадается на соединения, усиливающие токсичность химического вещества. Раствор ДМСО добавляют к полиглюкину (не наоборот!), доводя концентрацию ДМСО до 10%, и ставят на хранение при +4°C. Затем 10% раствор ДМСО добавляют в клеточную взвесь 1:1 без образования пены, после чего переводят в криопакет, герметизируют и замораживают по двухэтапной программе: на первом этапе со скоростью 1°C/мин до –13°C, на втором – 10°C/мин до –80°C или –196°C. Продолжительность хранения ГСК при –80°C составляет 2 года, при –196°C – до 5 лет. Замороженные ГСК с ДМСО требуют быстрого отогревания в водяной ванне при +39°÷41°C и последующего незамедлительного переливания пациенту. Такая методика обеспечивает сохранение биологических свойств более, чем у 80% миелокариоцитов.

Отмывание ДМСО от замороженных клеточных суспензий ведет к потере их части и снижает жизнеспособность последних на 30–40%. По названной причине многие специалисты не применяют отмывание замороженных ядерных клеток от ДМСО. В таких случаях резко увеличиваются риски посттрансфузионных реакций у реципиентов. Определено, что на каждые 70 трансфузий неотмытых от ДМСО клеточных суспензий развивается одно осложнение, связанное с токсичностью известного криоконсерванта. В том числе: генерализованные судороги, энцефалопатия, спазмы сосудов, рвота, дыхательная недостаточность, неприятный запах выдыхаемого воздуха у реципиента и редко – коматозное состояние [10].

### 1.5. Биэндоцеллюлярные криоконсерванты

#### 1.5.1. Биэндоцеллюлярный

*криоконсервант на основе пропиленгликоля и диметилацетамида для замораживания эритроцитов при –80°C и –140°C*

Авторами способа замораживания КЭ под защитой криоконсерванта на основе пропиленгликоля и диметилацетамида являются В.В.Вельяминов [12] и Ш.М. Багаутдинов [7]. Состав биокриоконсерванта включает: α-Пропиленгликоль (ВФС–42–1594–86),

370 г; ДМАЦ (N,N-диметилацетамид) х.ч. (ТУ 6–09–537–73, ГОСТ 3885–73, 100 г; Сахароза, чда, (ГОСТ 8833–75), 32 г; Натрия хлорид, чда, (ГФХ, с.428,442), 6 г; Вода для инъекций (ГФХ, с.74) до 1000 мл.

КЭ из крови 1–2 суточного хранения при +4°C смешивают 1:1 с бикриоконсервантом в «Гемаконе 500» при +20°C÷+25°C. При этом конечная концентрация пропиленгликоля составляет 18,5%, диметилацетамида – 5%. Полученную суспензию переводят в два контейнера «Компопласт 300», закладывают в холдеры и помещают либо в электрический морозильник на –80°C, либо в пары жидкого азота на 35–40 мин, после чего замороженные клетки переносят в электроморозильник-хранилище на –80°C. Размораживание эритроцитов проводят в водяной ванне при +42°÷45°C в течение 2–3 мин, отмывают общепринятым способом с использованием стандартных растворов с пониженной концентрацией ингредиентов и ресуспендируют в растворе ЦНИИГПК № 8-в. После размораживания количество эритроцитов составляет  $(3,95 \pm 0,04) \cdot 10^{12}/л$ , уровень свободного гемоглобина –  $0,69 \pm 0,05$  г/л и соответствует ( $P > 0,05$ ) показателям эритроцитов, замороженных с глицерином до –196°C.

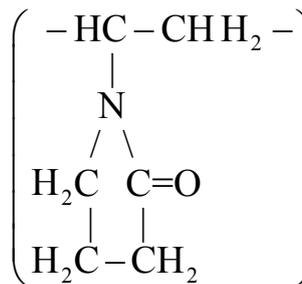
### Раздел 2. Криопротекторы и криоконсерванты второго класса

II класс образуют криоконсерванты на основе КНК; монокриоконсерванты содержат по одному КНК; бикриоконсерванты – по два КНК. Для их синтеза используют разные органические вещества, растворы которых обладают, как правило, слабыми криозащитными свойствами. Наиболее выраженными хладозащитными свойствами обладает ПВП и растворы на его основе; гидроксипропилкрахмал (ГЭК) и водные растворы на его основе.

#### 2.1. Краткие общие сведения о поливинилпирролидоне

Поливинилпирролидон (ПВП) – продукт полимеризации N<sub>1</sub>-винилпирролидона и ацетилена, структурная формула приведена по тексту ниже.

Структурная формула



ПВП синтезирован из аммиака и ацетилена Перрев 1941 году [Цит. по С.С.Лаврик [38]. В СССР приоритет в получении и первоначальном изучении ПВП принадлежит С.Н. Ушакову с соавт.[67] и М.Ф. Шостаковскому с соавт.[78]. рН раствора около 7,0; не вызывает раздражения при подкожных, внутримышечных и внутривенных введениях. ЛД<sub>50</sub> на мышах не установлена. При в/в введениях 25% раствора переносимая доза ПВП составила 8г/кг массы тела, летальная – 12–15 г/кг. ПВП термоустойчив, хорошо переносит стерилизацию в автоклаве. Водные растворы ПВП м.м. 12 000 – 25 000 являются фармакопейными препаратами и применяются в трансфузиологии в качестве плазмозаменителей, обладающих дезинтоксикационным действием. Примером может служить отечественный препарат Гемодез – 6% ПВП с м.м. 12 000 ± 2700.

Препараты ПВП с м.м. от 30 000 до 40 000 и больше могут содержать примеси альдегидов, которые способны индуцировать перекисные процессы в клетках и оказывать на них токсическое действие. Согласно данным [8, 38, 84] и других, отмечены деструктивные изменения ретикулоэндотелиальных клеток селезенки, а также длительная задержка ПВП в печени, селезенке, бронхах, костном мозге, почках, поджелудочной железе и других органах. Выведение растворов ПВП с м.м. 50 000 сопровождается образованием пристеночных тромбов и других осложнений.

Моноэктоцеллюлярные криоконсерванты на основе ПВП для замораживания ГСК костного мозга при  $-78^{\circ}\text{C}$ – $-196^{\circ}\text{C}$

Криопротекторные свойства ПВП достаточно полно изучены С.С.Лаврик [35, 37, 38]. В том числе разработаны методы замораживания ЯККМ под защитой 2 лекарственных форм.

Лекарственная форма № 1 включает: Поливинилпирролидон с м.м. 12 600, 17 г; Глюкоза, 10,2 г; Сыворотка группы АВ(IV), 10 г; Гепарин, 2500 МЕ; Бидистиллированная вода – до 100 мл. Защитную среду готовят ex tempore перед консервированием ЯККМ. Утверждена МЗ УССР 22.07.1971 года.

Стерильный криоконсервант соединяют с концентратом ЯККМ 1:1. При этом конечная концентрация ПВП в полученной суспензии составляет 8,5%. Суспензию клеток выдерживают при  $+2^{\circ}\text{C}$ – $+4^{\circ}\text{C}$  в течение 20–30 мин, затем замораживают по двухэтапной программе: на первом этапе со скоростью  $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до  $-20^{\circ}\text{C}$ , затем со скоростью  $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до  $-60^{\circ}\text{C}$ , после чего переносят в сосуд с твердой углекислотой при  $-78^{\circ}\text{C}$  на срок до 21 мес. Отогревание образцов ЯККМ производят в водяной ванне при

$+38^{\circ}\text{C}$  в течение 60–70 сек. При этом сохраняется  $86\pm 3,8\%$  жизнеспособных клеток. В случае помещения суспензии в жидкий азот ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) на срок от 21 мес. до 10 лет, сохраняется, соответственно, до  $90\pm 2,4\%$  и  $83,3\pm 0,97\%$  эозинорезистентных клеток.

Лекарственная форма № 2 имеет следующий состав: Поливинилпирролидон с м.м.  $12\ 600\pm 2\ 700$ , 200 г; Глюкоза, 100 г; Аминокротин, 50 мл; Натриевая соль сахарной кислоты, 20 г; Натрий фосфат трехзамещенный, 17 г; Вода для инъекций – до 1000 мл. рН 3,8–4,0.

Стерилизуют через фильтры Millipore с диаметром пор 0,22 мкм и повторно автоклавируют при  $105^{\circ}\text{C}$  в течение 45 мин. Приготовленный раствор стерилен, непирогенен, нетоксичен. Хранят в сухом темном помещении при комнатной температуре до 2 лет. Смешивают с концентратом ЯККМ 1:1, эквilibрируют при комнатной температуре 30 мин, замораживают по 2 этапной программе: на первом этапе – со скоростью  $0,8^{\circ}\text{C}$ – $1,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до точки кристаллизации, на втором – со скоростью  $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до  $-70^{\circ}\text{C}$ , после чего перекладывают в электроморозильник на  $-85^{\circ}\text{C}$ – $-90^{\circ}\text{C}$  на срок до 5 мес. При указанной технологии сохраняется  $63,5\%$  жизнеспособных ЯККМ.

П.М. Перехрестенко с соавт. [51] разработал метод консервирования ядерных клеток пуповинной крови при  $-80^{\circ}\text{C}$  ÷  $-196^{\circ}\text{C}$  под защитой моноэктоцеллюлярного криоконсерванта на основе ПВП. Изъятую пуповинную кровь тестируют по системам АВО, резус фактору, HLA, определяют иммунофенотип ГСК, подсчитывают число ядерных клеток и ГСК в 1 мкл стабилизированной взвеси 4:1 гемоконсервантом Глюгидир. Его состав: Натрий гидроцитрат для инъекций (ГФХ, стр.432), 20 г; Глюкоза (ГФ, стр.311), 30 г; Вода для инъекций (ГФХ, стр.74) до 1000 мл.

Стабилизированная кровь сохраняется при  $+4\pm 2^{\circ}\text{C}$  в течение 48 ч. Ядерные клетки выделяют из крови путем ее центрифугирования со скоростью 1200 об/мин, плазму отсасывают, замораживают при  $-20^{\circ}\text{C}$ – $-30^{\circ}\text{C}$  и сохраняют до размораживания ГСК и последующего ресуспендирования.

Для криоконсервирования концентрата ядерных клеток с ГСК используют криоконсервирующий раствор, в который входят: Поливинилпирролидон низкомолекулярный медицинский (ФС 42–1194–78), 17– г; Глюкоза (ГФХ, стр. 311), 100 г; Лактоза (ГФХ, с. 589), 40 г; Вода для инъекций (ГФХ, с.74) до 1000 мл.

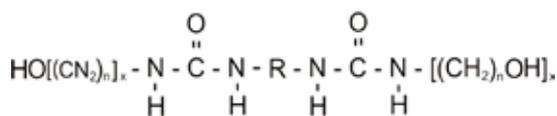
Раствор разливают в стеклянные флаконы вместимостью по 50 мл и 100 мл, автоклавируют при  $+120\pm 2^{\circ}\text{C}$  и давлении пара  $10,8\cdot 10^4\text{Па}$  ( $1,1\text{ кгс}/\text{см}^2$ ) в течение 30 мин.



введении животным в дозе 5 мл/кг не приводит к каким-либо патологическим изменениям в клетках и функции внутренних органов. Существует возможность негативного влияния ПЭО-1500 на плазматические мембраны при температурах +18°C и выше во время удаления его из деконсервированных клеток. Если контакт клеток с криопротектором проводится в условиях гипотермии (0÷+4°C), негативного действия ПЭО-1500 на форменные элементы крови не наблюдается. Выяснено, что 20–40% растворы ПЭО-1000 – ПЭО-4000 обеспечивают сохранность 80–98% клеток и являются веществами с низкой токсичностью. Однако, эритроциты, восстановленные после размораживания, все же имеют различные повреждения [8]. Показатели ЛД<sub>50</sub> для ПЭО-400 не установлены. ЛД<sub>50</sub> ПЭО-1500 у кроликов и крыс составляют, соответственно, 8 и 11,52 г/кг веса [11].

### 3.2. Монокриоконсервант смешанного действия на основе гексаметиленбистетрагидроксиэтилмочевины (ГМБТОЭМ) для замораживания ЯККМ

Химическая формула ГМБТОЭМ – (НОСН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NCONH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NHCON(CH<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>ОН)<sub>2</sub>.  
Его структурная формула



Синтез ГМБТОЭМ впервые осуществил в 1974 г. В.П.Архиреев с соавт. (А.с. № 419617).

Криопротекторные свойства ГМБТОЭМ (рабочее название А-378), имеющим м.м. 378, открыл Е.П. Сведенцов в 1981 г [47]. Установлена ЛД<sub>50</sub>, равная 15,5±0,6 г/кг массы белой лабораторной мыши, что значительно ниже, чем у других известных криопротекторов. Был разработан криоконсервант смешанного действия. Состав монокриоконсерванта: ГМБТОЭМ, 40 г; Лимонная кислота, 1 г; Динатриевая соль ЭДТА, 0,1 г; Бидистиллированная вода – остальное. рН раствора 7,0–7,4. Стерилизуют автоклавированием 30 мин при 120°C и 1,2 атм. рН криозащитного раствора 7,0–7,4.

Монокриоконсервант смешивают с концентратом ЯККМ 1:1. Экспозиция при +4°C составляет 20 мин. Суспензию замораживают по 3 этапной программе: на первом этапе со скоростью 1°C/мин до -8°C, на втором – 10°C/мин до -40°C, на третьем – 20°C/мин до -140°C и затем переносят в хранилище с жидким азотом. Число сохранившихся

ЯККМ составляет 91,5±1,8%, из которых эозинорезистентных – 80,3±4,4%. При в/в введении вещество не требует отмывания от размороженной клеточной суспензии.

Дальнейшие исследования свойств криопротектора на основе ГМБТОЭМ были продолжены учениками Е.П. Сведенцова [60]. Так, в ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России и лаборатории криофизиологии крови КНЦ УО РАН были синтезированы криоконсерванты «Гекмолит», «Кримолит», «Кримолит-М», «Кримолит-Ф» и другие монокриоконсерванты.

### 3.3. Монокриоконсервант смешанного действия «Кримолит» на основе ГМБТОЭМ для замораживания тромбоцитов при -196°C

Название криоконсерванта «Кримолит» утверждено приказом Минздрава № 1509 [53]. Согласно Патенту России № 1561227, в состав раствора включены: ГМБТОЭМ, 10%; Лимонная кислота, 1,1%; Динатриевая соль ЭДТА, 0,1%; Вода для инъекций, остальное. рН раствора 4,5–5,5.

Стерилизуют автоклавированием при 120°C и 1,2 атм 30 мин. Срок хранения при +4°C составляет 2 года. Смешивают с тромбоцитным концентратом (ТК) 1:1. Замораживают по линейной программе до -196°C. После размораживания в водяной ванне при +36÷+38°C в течение 10 с сохраняется 85–95% кровяных пластинок, у 47,2–95% сохраняется функциональная полноценность. Клинических испытания проведены с положительными результатами в ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России, Российском НИИГиТ и ВМА им. С.М. Кирова.

### 3.4. Монокриоконсервант смешанного действия «Кримолит-М» на основе ГМБТОЭМ для замораживания тромбоцитов при -80°C

Раствор «Кримолит-М» включает: ГМБТОЭМ безводная х.ч., 10 г; Лимонная кислота, 1,1%; Динатриевая соль ЭДТА, 0,1%; Вода для инъекций, остальное. рН раствора 4,5–5,5.

Стерилизуют автоклавированием при 120°C и 1,2 атм 30 мин. Срок хранения при +4°C составляет 2 года. Смешивают с ТК 1:1. Замораживают до -80°C по линейной или экспоненциальной программе в двух электроморозильниках последовательно на -30°C и -80°C. После размораживания в водяной ванне при +38°C в течение 44–60 с до +2÷+4°C сохраняется 83–94% кровяных пластинок, у 48,2–93% сохраняется функциональная полноценность.

**3.5. Усовершенствованный криоконсервант «Кримолит-Ф» на основе ГМБТОЭМ и фумарата натрия для замораживания тромбоцитов при  $-40^{\circ}\text{C}$**

Для повышения эффективности криоконсерванта за счет быстрого восстановления энергетических процессов в тромбоцитах, снижения токсичности в раствор были введены антигипоксикант фумарат натрия и антикоагулянт лимонная кислота. В итоге состав раствора «Кримолит-Ф» стал следующим: ГМБТОЭМ, 10%; Фумарат натрия, 1,9%; Лимонная кислота, 1,0%; Вода для инъекций, остальное. pH раствора 5,5–6,5.

Стерилизуют автоклавированием при 1,2 атм 30 мин. ТК смешивают с «Кримолит-Ф» 1:1 в пластиковом контейнере «Компопласт 300». Эквилибрация при комнатной температуре не превышает 20 мин, после чего клетки погружают в спиртовую ванну, охлажденную до  $-28^{\circ}\text{C}$  на 15 мин, а затем в камеру электроморозильника на срок до 4 мес при температуре  $-40^{\circ}\text{C}$ . Метод обеспечивает сохранность 87,4% тромбоцитов. Переливание аутологичных размороженных ТК подопытным животным не вызывало у них каких-либо посттрансфузионных реакций или осложнений.

**3.6. Монокриоконсервант смешанного действия на основе ГМБТОЭМ для замораживания концентрата лейкоцитов при  $-80^{\circ}\text{C}$**

Монокриоконсервант создан в ФГБУН Кировский НИИГиПК ФМБА России С.В.Утемовым [66]. Наилучшие результаты получены при использовании раствора следующего состава: ГМБТОЭМ, 30%; Лимонная кислота, 0,75%; Бидистиллированная вода – остальное. pH раствора 7,2.

Стерилизуют автоклавированием при  $120^{\circ}\text{C}$  и 1,2 атм 30 мин. Срок хранения при  $+4^{\circ}\text{C}$  составляет 2 года. Смешивают с КЛ 1:1. Замораживают по экспоненциальной программе: первоначально выдерживают в течение 25 мин при температуре адаптации  $-28\pm 2^{\circ}\text{C}$ , затем переносят в электроморозильник на  $-80^{\circ}\text{C}$  на хранение до 12 мес. Разработанный криоконсервант обеспечивает высокую морфологическую ( $87,3\pm 3,3\%$ ) и выраженную функциональную ( $52,5\pm 10,2\%$ ) сохранность лейкоцитов, которые не требовали отмывания от ГМБТОЭМ.

В результате проведенных биологических исследований установлено, что разработанный монокриоконсервант для лейкоцитов стабилен в процессе замораживания-отогревания и безвреден для реципиента.

**3.7. Монокриоконсервант смешанного действия на основе ГМБТОЭМ и фумарата натрия при замораживании лейкоцитов при  $-40^{\circ}\text{C}$**

Монокриоконсервант для замораживания лейкоцитов создан впервые в процессе лабораторно-экспериментального исследования [81].

Состав криоконсерванта: ГМБТОЭМ, 30%; Фумарат натрия, 2,8%; Лимонная кислота, 0,06%; Бидистиллированная вода-остальное. pH раствора 7,0–7,4.

Смешивают с ЛК 1:1, выдерживают при комнатной температуре в «Компопласт 300» до 20 мин. Замораживают в 3 этапа: на первом этапе – со скоростью  $7-8^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до точки кристаллизации, на втором-  $1-2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до температуры  $-28^{\circ}\text{C}$ , на третьем-  $3-4^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до  $-40^{\circ}\text{C}$ . Лейкоциты хранили в электроморозильнике фирмы Derby (Дания) в течение 30 суток.

Клеточную взвесь размораживают в водяной ванне при  $+38^{\circ}\text{C}$  в течение 45–60 сек при интенсивном покачивании биоконтейнера до температуры суспензии  $+2\div +4^{\circ}\text{C}$ . К данному времени сохраняется 87,3% лейкоцитов, из которых 61,9% имеют неповрежденную мембрану, 94,5% нейтрофилов проявляют фагоцитарную активность и имеют высокий (в 3,5 раза выше исходного уровня) окислительно-восстановительный метаболизм.

Биологические исследования криоконсерванта не выявили морфологических и функциональных изменений у подопытных лабораторных животных и показали перспективность данного метода криоконсервирования лейкоцитов.

**3.8. Монокриоконсервант смешанного действия на основе ГМБТОЭМ и сукцината 3-окси-6-метил-2этилинпиридина (ГОИПЭП) для замораживания лейкоцитов при  $-20^{\circ}\text{C}$**

Впервые в криобиологической практике для биологических и медицинских лабораторий создан метод сохранения лейкоцитов в полноценном состоянии при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Оптимальным определен следующий состав криоконсерванта: ГМБТОЭМ, 28%; Сукцинат ГОМЭП, 0,15%, Вода для инъекций – остальное pH раствора 7,0–7,4 [48].

Лейкоциты получали из крови доноров-добровольцев. В выделенные концентраты лейкоцитов (ЛК) вносили указанный монокриоконсервант в соотношении 1:1, выдерживали при комнатной температуре в пластиковом контейнере «Компопласт 300» до 20 мин. Клеточную взвесь замораживали до  $-20^{\circ}\text{C}$ , после чего переносили в электроморозильник.

розильник фирмы Derby (Дания) для хранения на протяжении до 90 суток. Клеточную взвесь размораживают в водяной ванне при +38°C в течение 45–60 сек при интенсивном покачивании биоконтейнера до температуры суспензии +2÷+4°C. В размороженной суспензии сохраняется 88,5% лейкоцитов, из которых 62,9% имеют неповрежденную мембрану, 93,9% нейтрофилов, проявляют фагоцитарную активность и окислительно-восстановительный метаболизм. Биологических исследования криоконсерванта не выявили морфологических и функциональных изменений у подопытных лабораторных животных и показали перспективность данного метода криоконсервирования лейкоцитов.

#### **Раздел 4. Криопротекторы и криоконсерванты четвертого класса IV класс – комбинированные эндоцеллюлярно-экзоцеллюлярные криоконсерванты**

В настоящее время перспективным направлением в криобиологии является применение комбинированных криоконсервантов. В их состав (по причине видоспецифичности биологического материала) могут быть включены «улучшающие» добавки, спектр которых весьма вариабелен. Показана целесообразность использования в качестве дополнительных компонентов криозащитных составов веществ биологического происхождения (антифризные протеины и гликопротеины, а также липиды замораживаемого организма). Последние, кроме того, что активно влияют на форму и размеры микрочастиц льда, могут также участвовать в репарации поврежденных при замораживании – отогреве клеточных мембран [60].

#### **4.1. Комбинированный криоконсервант «Гемжел» на основе глицерина и ПВП для замораживания ГСК костного мозга при –196°C**

Разработан в ГНЦ РАМН [65]. Криоконсервант включает: Высокоочищенный глицерин, 66 мл; ПВП с м.м. 12600±2700, 70 г; Динатриевая соль ЭДТА, 1 г; Раствор желатина медицинского 10% для инъекций, 200 мл; Натрий цитрат трехзамещенный, 10 г; pH раствора до 7,0–7,4; Гемодез – до 1000 мл.

Препарат нетоксичен, апирогенен. Стерилизуют фильтрацией через Millipore с диаметром пор 0,22 мкм и асептично фасуют в стеклянные флаконы по 100 – 250 мл. Приготовленный «Гемжел» добавляют в костно-мозговую взвесь 1:1, осторожно пере-

мешивают, выдерживают при комнатной температуре до 30 мин, с помощью системы для переливания крови с фильтром переводят по 120 мл в криоконтейнеры емкостью 160 мл, герметизируют, паспортизируют и направляют для замораживания. Охлаждение проводят по двухступенчатой программе: на первом этапе – со скоростью 1°C/мин до 9°C, на втором – 10°C/мин до -185°C, после чего переносят в хранилище с жидким азотом (-196°C), в котором хранят более 15 лет. Размораживают в течение 43–45 мин. Через 7 лет криоконсервирования в этих условиях сохраняются жизнеспособными 71,4% ЯККМ и 78,3% ГСК КМ [62, 63].

#### **4.2. Комбинированные криоконсерванты на основе глицерина и препаратов желатина для сохранения гранулоцитов в состоянии холодового гипобиоза (-10°C)**

Разработаны Е.П. Сведенцовым в 2004 г. в Институте физиологии Коми научного центра УрО РАН [60]. Для защиты клеток от неблагоприятных факторов холодового стресс-воздействия оптимальными показали себя рецепты № 3 и № 7.

Криоконсервант № 3 включает следующие компоненты: Высокоочищенный глицерин, 7%; Модежел, 85,6%; Сукцинат гидроксиметилэтилпиридина, 0,3%; Цитрат натрия, 1,4%; Вода для инъекций – остальное.

Криоконсервант № 7 имеет следующий состав: Высокоочищенный глицерин, 7%; Желатиноль, 70%; Сукцинат гидроксиметилэтилпиридина, 0,3%; Лимонная кислота, 1 г; Трилон Б, 0,1 г; Вода для инъекций – остальное. pH раствора доводят до 7,0–7,4 10 н каплями водного гидроксида натрия.

Каждый раствор смешивают с КЛ в соотношении 1:1, выдерживают 20 мин в контейнере «Компопласт 300» при комнатной температуре, затем переносят в ванну с 45% этиловым спиртом, охлажденным до -10°C, на 40–45 мин (с раствором № 3) и 25–27 мин (с раствором № 7). Отогревают в 10-литровой водяной ванне в течение 2–4 сек. В указанных криоконсервантах гранулоциты не замерзают, входят в состояние холодового гипобиоза и через 9 суток после выхода из него сохраняют высокую способность к фагоцитозу (76,7±5,0% для раствора № 3 и 72,6±3,8% для раствора № 7). Значительная часть функциональной активности клеток сохраняется на уровне 75,7 и 61,4% соответственно).

Биологические испытания растворов показали, что криоконсерванты нетоксичны, апирогенны и не требуют отмывания от биообъекта [60].

**4.3. Комбинированный криоконсервант на базе ГМБТОЭМ и ДМСО для замораживания лейкоцитов при  $-80^{\circ}\text{C}$**

Разработаны Е.П. Сведенцовым и соавт. в 2003 г. в Институте физиологии Коми научного центра УрО РАН [60]. Лучшая сохранность лейкоцитов по функциональным и морфологическим характеристикам после замораживания до  $-80^{\circ}\text{C}$  и отогревания клеток наблюдается после применения криозащитного раствора следующего состава: ГМБТОЭМ, 22%; ДМСО, 8%; Сукцинат ГОМЭП, 02%, Вода для инъекций – остальное.

Криоконсервант смешивают с ЛК в соотношении 1:1, выдерживают 20 мин в контейнере «Компопласт 300» при комнатной температуре. Замораживают по нелинейной программе в течение 54–55 мин. Суспензию размораживают в водяной ванне при  $+35^{\circ}\text{C}$  35–50 с до температуры содержимого биоконтейнера  $+2^{\circ}\text{C}$ – $+4^{\circ}\text{C}$ . После размораживания через сутки сохраняется  $96,8 \pm 4,2\%$  лейкоцитов, эозинорезистентных клеток –  $88,6 \pm 7,3\%$ . Фагоцитарная активность нейтрофилов составляет  $75,5 \pm 8,5\%$  по отношению к исходной. Те же показатели после размораживания ЛК спустя 180 суток составляют  $89,3 \pm 6,4\%$ ,  $91,0 \pm 5,1\%$  и  $76,7 \pm 14,7\%$  соответственно. Комбинированный криоконсервант рекомендуется в научных целях.

**4.4. Комбинированный криоконсервант на базе ГМБТОЭМ и  $\alpha$ -пропиленгликоля для замораживания ГСК костного мозга млекопитающих при низкой температуре**

Разработан в ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России для замораживания ГСК при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ – $-90^{\circ}\text{C}$  [60]. Лучшие результаты по морфологической сохранности и пролиферативной способности после размораживания ЯККМ получены с применением криозащитного раствора следующего состава: ГМБТОЭМ, 30 г;  $\alpha$ -пропиленгликоль, 1 г; Динатриевая соль ЭДТА, 0,1 г; Лимонная кислота, 1 г. pH раствора – 7,0–7,38.

Криоконсервант смешивают с суспензией ГСК в соотношении 1:1 при комнатной температуре, выдерживают в течение 20 мин и замораживают по 3 ступенчатой программе: на первом этапе –  $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до  $-7^{\circ}\text{C}$ , на втором –  $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до  $-40^{\circ}\text{C}$ , на третьем –  $20^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до  $-80^{\circ}\text{C}$ – $-90^{\circ}\text{C}$ . После отогревания контейнера с костно-мозговой взвесью при температуре воды  $+39^{\circ}\text{C}$  в течение 20–25 с до температуры биообъекта  $+2^{\circ}\text{C}$  сохраняется 92% ЯККМ. Предложен-

ный криоконсервант нетоксичен, апирогенен, не требует отмывания его от размороженных ЯККМ.

**4.5. Комбинированный криоконсервант на базе ГЭК и ДМАЦ для замораживания ядерных клеток крови до температуры  $-80^{\circ}\text{C}$ – $-196^{\circ}\text{C}$**

Разработан в лаборатории консервирования крови и тканей ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России А.А. Костяевым, К.А. Ветошкиным и С.В. Утемовым в 2006 г. [60].

Криоконсервант имеет следующий состав: ДМАЦ (х.ч.), 3,5 мл; ГЭК (в составе «Инфукол ГЭК»), 46,3 мл; Фосфатный буфер ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , моль). pH раствора 6,5–7,0.

При замораживании ядерных клеток до температуры  $-80^{\circ}\text{C}$  и последующем отогревании обеспечивает сохранность 94,2–97,1% функционально полноценных клеток. При замораживании до температуры  $-196^{\circ}\text{C}$  и последующем отогревании обеспечивает сохранность 92,7–97,8% функционально активных клеток.

**Раздел 5. Биокристаллоное тестирование токсичности некоторых криоконсервантов**

В настоящее время метод консервации крови и ее компонентов при низких и ультранизких температурах служит базовым способом их длительного хранения вне организма человека без потери клетками функциональных свойств [9,18, 59, 103]. При этом особую ценность приобретают методы тестирования биологической активности гемоконсервантов и оценки адекватности режимов сохранения биоматериала [18, 20, 59]. Нашей исследовательской группой на протяжении последних 10 лет изучаются возможности методов биокристалломики для решения этого круга задач, в частности – исследование сохранности кристаллогенных свойств плазмы крови с учетом вида криопротектора и режима консервирования биосубстрата «плазма + криопротектор».

Оценку кристаллогенных свойств биологического субстрата, в который предварительно был внесен криопротектор [5% раствор ДМСО, ТКД или 5% раствор Глицерина в сочетании с 4% раствором Глюкозы], производили до начала и по завершении консервации. Были выбраны режимы консервации (экспозиции) при положительных ( $22^{\circ}\text{C}$ – $24^{\circ}\text{C}$  и  $37^{\circ}\text{C}$ ) и отрицательных ( $-80^{\circ}\text{C}$  и  $-196^{\circ}\text{C}$ ) температурах. Для изучения характера сокристаллизации систему «биожидкость – криоконсервант» исследовали на предметном стекле, на котором впоследствии производили ее дегидратацию без термической стимуляции. Исследование

кристаллизации сформированных жидких систем осуществляли путем качественного и количественного анализа с использованием комплекса визуаметрических параметров [41–44].

На первом этапе работы были уточнены особенности кристаллогенной активности самих криопротекторов. Установлено, что все они в индивидуальном виде обладают минимальной способностью к формированию кристаллических и/или псевдокристаллических структур.

В целях уточнения визуаметрических особенностей фаций различных криоконсервантов проведен морфометрический анализ последних через 4 и 24 часа экспозиции при 37°C. Особенности кристаллогенеза криопротекторов, четко просматриваемые и при докритериальной оценке микропрепаратов, нашли отражение в значениях полуколичественных показателей. Так, кристаллогенная активность ТКД минимальна в обеих точках наблюдения, а формируемые структурные элементы имеют выраженные признаки деструкции и отчетливую краевую зону. Остальные криозащитные средства к завершению суток дегидратации образовывали специфичную фацию с переменным количеством одиночных и дендритных кристаллов.

На втором этапе производили оценку характера и особенностей сокристаллизации трех изучаемых криоконсервантов с аликвотным количеством плазмы крови, полученной от доноров. Результат дегидратации исследовали через 4 и 24 часа экспозиции при 37°C. Следует подчеркнуть, что максимальным ингибирующим эффектом в отношении плазмы крови здоровых доноров обладает комбинация криоконсервантов «Глицерин + Глюкоза», в фациях с которой кристаллические структуры практически не образуются. Менее выраженные ингибирующие свойства присущи ТКД, формирующем при сокристаллизации с изучаемой биологической жидкостью многочисленные «разломы», присутствующие во всех зонах микропрепарата, а также агрегаты аморфных образований, расположенные преимущественно в промежуточной зоне.

Фация, полученная при совместной дегидратации плазмы крови и ДМСО, морфологически наиболее соответствует характеру нативной структуризации данного биосубстрата: в образце четко выделяются все основные зоны; «разломы» краевой зоны регулярны, центростремительны; в центральной зоне наблюдается умеренное количество кристаллических элементов.

Различный характер структуризации изучаемых биосистем полностью подтверж-

дают результаты визуаметрического анализа фаций. Так, наиболее выраженными и максимально приближенными к физиологическим кристаллогенными свойствами обладает биосистема, содержащая ДМСО. Применение Глицерина и Глюкозы в качестве криопротектора, напротив, ингибирует скорость и активность структурообразования. ТКД занимает промежуточное положение между ними. Это проявляется в уровне всех основных морфометрических показателей как через 4, так и через 24 часа экспозиции при 37°C.

На основании этой серии экспериментов установлено, что по «мягкости» физиологического эффекта в отношении сыворотки крови в незамороженном состоянии консерванты формируют ряд: «ДМСО > ТКД > Глицерин + Глюкоза».

В третьей серии экспериментов выполнен анализ влияния режима замораживания систем «плазма крови – криоконсервант» на кристаллогенные свойства последней. Выявлено, что через 4 часа экспозиции при 37°C интактных и подвергавшихся замораживанию биосистем, содержащих в качестве криопротектора ТКД, формируются различные кристаллоскопические картины. Так, если сокристаллизация биосреды с криоконсервантом приводила к фации, образованной немногочисленными аморфными элементами, то предварительное их охлаждение увеличивало кристаллогенный потенциал системы, о котором судили по кристаллизуемости и индексу структурности, обратно пропорционально степени ее замораживания.

При замораживании до –80°C и экспозиции при 37°C в течение 24 часов в образцах системы «плазма крови – ТКД» наблюдали формирование минимальной, но достаточно четкой краевой зоны; в центральной зоне – многочисленные неоформленные структурные элементы. Следует отметить, что в данном случае в картине обнаруживаются широкие «разломы» краевой зоны, распространяющиеся вплоть до центра образца. При более глубокой заморозке (до –196°C) фация остается цельной, но отчетливого формирования краевой зоны и регулярных кристаллических элементов не происходит. Морфометрический анализ образцов данной серии подтверждает указанные тенденции: за счет многочисленных структурных элементов в фациях биосистем при –80°C регистрируются более высокие значения индекса структурности и кристаллизуемости как через 4, так и через 24 часа экспозиции при 37°C по отношению к исходному состоянию биосистемы и более глубокой заморозке. В то же время в результате замо-

раживания до  $-196^{\circ}\text{C}$  уровень большинства морфометрических параметров в меньшей степени отличался от характерного для второго режима криоконсервации. В целом, в серии с использованием в качестве криопротектора ТКД, наиболее оптимально сохранились кристаллогенные свойства при замораживании до температуры  $-196^{\circ}\text{C}$  по сравнению с режимом замораживания до  $-80^{\circ}\text{C}$ . Данная тенденция обнаруживалась как через 4 ч, так и через 24 часа экспозиции при  $37^{\circ}\text{C}$ .

Вторым из изучаемых консервантов служил ДМСО, в случае применения которого через 4 часа экспозиции при  $37^{\circ}\text{C}$  при предварительном замораживании биосистемы до  $-80^{\circ}\text{C}$  отмечали выраженное ингибирование кристаллогенеза с формированием лишь единичных одиночно-кристаллических структур в центре образца, тогда как при охлаждении до  $-196^{\circ}\text{C}$  общая структурная организация фации сохранялась аналогичной интактному образцу. Через 24 часа экспозиции при  $37^{\circ}\text{C}$  структурные различия между фациями биосистем, подвергнутых воздействию исследуемых режимов замораживания, минимализировались. Наблюдающиеся в этот срок вариации преимущественно касались организации краевой и промежуточной зон микропрепаратов. Критериальный анализ результатов собственной кристаллизации сформированных биосистем также указал на более быстрые темпы структуризации образцов, подвергнутых наиболее глубокой заморозке ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), что просматривалось по уровню индекса структурности, кристаллизруемости и степени деструкции фации через 4 часа экспозиции при  $37^{\circ}\text{C}$ . Как отмечалось выше, значения показателей, характерные для изучаемых режимов криоконсервации, через 24 часа экспозиции при  $37^{\circ}\text{C}$  сближались, но более физиологичным оставалось применение охлаждения до  $-196^{\circ}\text{C}$ . Таким образом, 5% раствор ДМСО во всех пробах демонстрировал большую сохранность физиологической картины структуризации, чем ТКД. Кроме того, при замораживании в условиях охлаждения до  $-80^{\circ}\text{C}$  процессы дегидратации и структуризации протекали быстрее, чем при  $-196^{\circ}\text{C}$ , однако сохранность кристаллогенных свойств сформированной системы «сыворотка крови – криоконсервант», как и в случае использования ТКД, была выше при замораживании до  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Последним из рассматриваемых в эксперименте криопротекторов являлась комбинация «5% раствор Глицерина + 4% раствор Глюкозы». С учетом того, что практически все сахара – сильные ингибиторы кристал-

логенеза, во всех пробах данной серии наблюдается существенно меньшая скорость и активность кристаллообразования, что наиболее наглядно иллюстрирует результат структуризации биосистем через 4 часа экспозиции при  $37^{\circ}\text{C}$ . Особенно выражена указанная тенденция в отношении консервации при  $-80^{\circ}\text{C}$ , когда регистрируется практически тотальное ингибирование кристаллизации. Через сутки с момента нанесения биоматериала на предметное стекло в образце системы, подвергнутой криовоздействию при  $-80^{\circ}\text{C}$ , признаков структуризации практически не обнаруживается. Напротив, при более глубокой заморозке сформированная фация в целом соответствует исходной, а в центральной зоне дополнительно появляется умеренное количество монокристаллов неопределенной формы.

Приведенные тенденции детерминируют и соответствующие результаты визуального анализа: практически полное отсутствие признаков кристаллизации образца при  $-80^{\circ}\text{C}$  отражается в околонулевых значениях большинства показателей, а при  $-196^{\circ}\text{C}$  через 4 часа экспозиции при  $37^{\circ}\text{C}$  регистрировали активацию кристаллообразования, частично нивелирующуюся к завершению анализа (24 часа экспозиции при  $37^{\circ}\text{C}$ ).

Так, если в серии микропрепаратов нативной плазмы при добавлении криопротекторов без замораживания признаки четкой структуризации регистрируются уже через 4 часа экспозиции при  $37^{\circ}\text{C}$ , то при охлаждении в режиме « $-80^{\circ}\text{C}$ » минимальная кристаллизация выявляется только через 24 часа экспозиции при  $37^{\circ}\text{C}$ . При замораживании, производимом в режиме « $-196^{\circ}\text{C}$ », скорость структуризации значительно выше, а формирующаяся картина более близка к характерной для незамороженной системы «сыворотка крови – криоконсервант».

Таким образом, на основании проведенных исследований установлено, что по кристаллогенным свойствам среди изученных криоконсервантов наиболее физиологичен диметилсульфоксид, причем предпочтительным является режим замораживания, соответствующий  $-196^{\circ}\text{C}$ .

### Заключение

В заключение следует отметить, что среди веществ различных по химической природе в середине прошлого столетия был выделен класс, обладающих функциональной общностью – проявлять хладозащитные свойства в отношении клеточных суспензий крови и костного мозга на этапах их замораживания-оттаивания. С открытием крио-

протекторов ученым удалось найти решение одной из насущных проблем человечества – длительного сохранения живыми различных биосистем в замороженном виде. В это же время получила развитие новая наука – криобиология и учение о криопротекторах. Применение высокотехнологичных методов исследований, позаимствованных из химии, криофизиологии, криобиологии, токсикологии, фармакологии, трансфузиологии, других разделов естествознания, привело к существенному прогрессу в раскрытии тайн холодового гипо- и анабиоза. Отечественными и зарубежными учеными выявлены хладозащитные вещества природного генеза, а также впервые синтезированы десятки криопротекторов, на базе которых созданы криоконсерванты для определенных видов клеток. Важной вехой криобиологии стали исследования по разработке различных классификаций криопротекторов. Авторы использовали принцип принадлежности криопротекторов к определенным классам химических веществ по степени выраженности криопротекторных свойств, молекулярной массе, способности проникать через плазматическую мембрану клетки, зависимости сохранности клеток от скорости проникновения криопротектора внутрь биообъекта и другим характеристикам.

В работе представлены классификации криопротекторов, используемые в отечественной и зарубежной медицине. Широкие научные и практические возможности открывает классификация, разработанная Е.П. Сведенцовым в 2010 г. [60] и его школой для систематизации имеющихся сложных хладоограждающих растворов, а также создающихся новых композиций криофилактиков. Она учитывает устоявшиеся за многие десятилетия названия криопротекторов и их свойства, которые были описаны и обоснованы [55, 92–94].

В настоящее время стало возможным длительно (месяцы, годы) сохранять полноценными в замороженном виде эритроциты, концентраты тромбоцитов, лейкоцитов, ядерных клеток венозной, пуповинной крови, костного мозга и других тканей с лечебной целью. Размороженные клеточные суспензии активно используются при лечении лейкозов, апластической анемии, сепсиса, миелодиспластического синдрома, некоторых солидных опухолей и других тяжелых заболеваний.

В результате получения достаточного опыта по применению моно-, би- и комбинированных криоконсервантов для замораживания микро- и макрообъектов выяснилось, что задача получения идеального нетоксичного криопротектора остается не-

решенной. Кроме того, имеются доказательства, что те химические соединения, которые обладают наиболее выраженными криопротекторными свойствами, одновременно проявляют и значительную токсичность на клеточном и организменном уровне. Отмывание токсичных криопротекторов от размороженных клеток, которое используется в современной клинической практике, не удовлетворяет исследователей и обоснованно критикуется.

Отмечено, что лабораторные технологии по определению токсичности криопротекторов и криоконсервантов на их основе требуют совершенствования, поскольку развивающиеся на микроуровне патологические процессы протекторного генеза не диагностируются.

Предметом специального изучения является понимание механизма развития посттрансфузионных реакций и осложнений у реципиентов протекторного генеза на молекулярном и субмолекулярном уровне биологических систем организма человека [29]. Показана важная роль в проведении исследований по разработке метода индивидуального подбора безопасного криопротектора и гемоконсерванта на его основе для реципиента *in vitro* на раннем доклиническом уровне. В этом плане особые надежды ученые связывают с использованием современных методов биокристалломики, расшифровкой фаций твердой организации дегидратированных капель сыворотки крови систем «кровь-гемоконсервант», других нерешенных аспектов повышения эффективности трансфузий криоконсервированных КДК и костного мозга.

#### Список литературы

1. Абезгауз Н.Н., Леонтович В.А. Замораживание белых клеток периферической крови для длительного хранения при ультранизких температурах // Проблемы гематологии и переливания крови. – 1966. – № 9. – С. 24–30.
2. Аграненко В.А., Файнштейн Ф.Э., Ермолович С.В. Биологические свойства криоконсервированных лейкоцитов и их клиническое применение // Проблемы гематологии и переливания крови. – 1982. – №4. – С. 6–10.
3. Аграненко В.А. Раствор «Тромбокриодмац». Временная фармакопейная статья 42–1586–85 от 16.12.1985.
4. Аграненко В.А., Абезгауз Н.Н., Трошина В.М. и др. Консервирование гранулоцитов с раствором «Лейкокриодмац» // Гематология и трансфузиология. – 1986. – №12. – С. 26–29.
5. Аграненко В.А., Бахрамов С.М., Жеребцов Л.А. Компонентная гемотерапия – Ташкент: Изд-во «Ибн-Сина», 1995. – 279 с.
6. Азовская С.А. Криоконсервирование тромбоцитов // Гематология и трансфузиология. – 1995. – Т. 40, № 1. – С. 22–24.
7. Багаутдинов Ш.М. Совершенствование методов долгосрочного хранения крови и костного мозга в замороженном состоянии в службе крови вооруженных сил. Автореф. дис. докт. биол. наук. – СПб., 1998. – 29 с.

8. Белоус А.М., Шраго А.М., Пушкарь Н.С. Криопротекторы. – Киев: Наук. думка, 1979. – 198 с.
9. Белоус А. М., Грищенко В. И. Кробиология. Киев: «Наукова думка», 1994. – 432 с.
10. Берсенев А.В. Судороги и кома как осложнения, связанные с токсичностью криопротектора (ДМСО) при инфузии гемопоэтических клеток в клинике трансплантации костного мозга // Клеточная трансплантология и тканевая инженерии. – 2006. – № 1. - С.31–32.
11. Брук М.М., Пушкарь Н.С., Шкуро В.К. К влиянию полиэтиленоксида на организм животных // Научные труды Харьковского мед. института. – 1968. – Вып. 78. – С.18–22.
12. Вельяминов В.В. Низкотемпературное консервирование эритроцитов под защитой комбинированного криопротектора на основе пропиленгликоля и диметилацетамида: Автореф: дис. канд. мед. наук. - СПб, 1997. - 21 с.
13. Воротилин А.М. Криоконсервирование эритроцитов человека под защитой криопротекторов на основе низкомолекулярных диолов: Автореф: дис. докт биол. наук. – Харьков, 1987. – 32 с.
14. Воротилин А.М., Гучок В.М., Калеко С.П. и др. Новый препарат «Пропиленгликоль» – эффективный криоконсервант эритроцитов // Успехи современной кробиологии. II Международная конференция 20–25.IV.1992. Тезисы. - Харьков, 1992. – С.34 – 35.
15. Вредные вещества в промышленности: Справочник для химика, инженера и врачей. – 7-е изд. - Л.: Химия, 1976. – Т. 2. – 594 с.
16. Гайсенюк Л.А. Изучение полиэтиленоксида-400 при низкотемпературном консервировании и трансплантации костного мозга в онкологической клинике: Автореф: дис. канд.мед.наук.- Харьков, 1972. – 17 с.
17. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – Киев, Наукова думка, 1994. – 143 с.
18. Гордиенко Е.А., Товстяк С.В., Сведенцов Е.П., Костяев А.А. Биофизика клеточных мембран. – Сыктывкар, 2009. – 304 с.
19. Государственная фармакопея Российской Федерации. Издание XII, Часть 1. Биологические методы контроля: ОФС 42–0060–07, ОФС 42–0062–07. М., 2007.
20. Гулевский А.К., Михалев О.И, Рязанцев В.В. О физических состояниях и криозащитных свойствах растворов холинхлорида // Кробиология. – 1987. – №1. – С. 17–21.
21. Гучок В.М., Верховский Б.А., Козлова В.Ф. и др. О токсичности полиэтиленоксида-1500 // Тезисы докл. III съезда фармакологов УССР. – Винница, 1977. – С.52–54.
22. Гучок В.М. Сравнительное исследование токсичности этиленгликоля. ПЭО-400 и ПЭО-1500 для крыс и мышей в раннем онтогенезе.- Кробиология и криомедицина, 1980, вып. 7. – С.34–39.
23. Гучок В.М. Зборовская Э.А. О токсичности  $\alpha$ -пропиленгликоля // Кробиология и криомедицина, 1981, вып. 8. – С.46–49.
24. Зинченко А.В., Боброва Е.Н., Щетинский М.И. Влияние ДМСО на фазовые переходы и стеклование в суспензии эритроцитов кордовой крови ниже 0°C // Проблемы кробиологии. – 2003, №2. – С. 16–21.
25. Инструкция по криоконсервированию лейкоцитов с применением «Лейкокриодмац» ЦНИИ гематологии и переливания крови. – М., 1985. – 6 с.
26. Иткин А.М. Исследование некоторых физических процессов, происходящих при замораживании костного мозга: Дис...канд. биол. наук. – Харьков, 1972. – 223 с.
27. Компаниец А.М. Функциональная полноценность тромбоцитов, сохраняемых при различных температурных режимах: Автореф: дис. ... канд. биол. наук. – М., 1992. – 22 с.
28. Костяев А.А. Низкотемпературное консервирование гемопоэтических стволовых клеток в режиме быстрого двухступенчатого замораживания (экспериментальное исследование). Дисс. ... докт. мед. наук. – СПб, 2003. – 228 с.
29. Краевой С. А., Колтовой Н. А. Диагностика по капле крови. Кристаллизация биожидкостей. Книга 1. Кристаллизация сыворотки крови методом открытой капли (угловая дегидратация). – М., 2014. – 248 с.
30. Криоконсервирование клеточных суспензий / Цуцаева А.А., Аграненко В.А., Федорова Л.И. и др.; [Под общ. ред. Цуцаевой А.А.]. – Киев: Наук.думка, 1983. – 240 с.
31. Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В. Криопротекторы. – Киев: Наук.думка, 1978. – 204 с.
32. Криопротекторы / Белоус А.М., Шраго М.И., Пушкарь Н.С.- К.: Наук. думка, 1979. – 198 с.
33. Кузнецов К.В. Консервирование тромбоцитов замораживанием при –80°C по экспоненциальной программе: Автореф: дисс. канд. мед. наук. СПб, 2006. -23 с.
34. Лаврик С.С. Консервирование костного мозга глубоким замораживанием // Материалы расширенной республиканской научной конференции. – Ереван, 1964. – С.131–133.
35. Лаврик С.С. Применение поливинилпирролидона в качестве защитной среды для консервирования костного мозга глубоким замораживанием // Врачебное дело. – 1966, № 32. – С.63–68.
36. Лаврик С.С. Консервирование костного мозга глубоким замораживанием: Автореф: дис. ... докт. мед. наук. – Киев, 1966. – 48 с.
37. Лаврик С.С. О длительном хранении костного мозга человека, консервированного с помощью поливинилпирролидона при температуре –196°C. XII Международный конгресс по переливанию крови. – М., 1969. – 52 с.
38. Лаврик С.С. Консервирование костного мозга.- Киев: «Здоров'я», 1975. – 126 с.
39. Леонтович В.А., Абезгауз Н.Н., Трошина В.М. Метод замораживания гранулоцитов с диметилацетамидом.- В кн.: Современные проблемы кробиологии и криомедицины. М.: Внешторгиздат, 1975. – С.77–84.
40. Максимов Н.А. О вымерзании и холодостойкости растений. Экспериментальные и клинические исследования. – СПб., 1913. – 149 с.
41. Мартусевич А. К., Камакин Н. Ф. Кристаллография биологической жидкости как метод оценки ее физико-химических свойств // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – Т. 143, №3. – С. 358–360.
42. Мартусевич А.К., Зимин Ю. В. Экспериментальная кристалломика – моделирование биокристаллогенеза // Вестник новых медицинских технологий. – 2008. – Т.15, №1. – С. 14–17.
43. Мартусевич А.К. Биокристалломика как наука о спонтанном, направленном и управляемом биокристаллогенезе // Информатика и системы управления. – 2008. – №2. – С. 145–148.
44. Мартусевич А.К., Камакин Н.Ф., Иванникова Е.В. и др. Характер действия физико-химических факторов на особенности структуризации сыворотки крови человека *in vitro* // Бюллетень физиологии и патологии дыхания.- 2012.- Вып. 43. – С. 112–115.
45. Мельникова В.Н., Замалетдинова Т.В., Кирьянова Г.Ю. Усовершенствование методов консервирования эритроцитов при умеренно- и ультранизких температурах // Мед. технологии, 1995. – №5. – С.23–26.
46. Мельникова В.Н., Плешаков В.Т., Селиванов Е.А. Заготовка, консервирование крови и ее компонентов // В кн.: Руководство по общей и клинической трансфузиологии / Ю.Л. Шевченко, В.Н.Шабалин, М.Ф.Заривчакский, Е.А. Селиванов. – СПб.: ООО «Издательство Фолиант», 2003. – С.115–150.
47. Патент № 3016824, 20.01.1981. Сведенцов Е.П., Архиреев В.П., Симкин Д.С., Кузнецов Е.В. Средство для криоконсервирования костного мозга // Патент России № 2049391. Оpubл.10.12.1995. Бюл. 34.

48. Патент № 2004101597/15, 19.01.2004. Сведенцов Е.П., Туманова Т.В., Камышева Е.С. др. Протекторный раствор для консервирования лейкоцитов при температуре -10°C // Патент России № 2261595 Оpubл.10.10.2005. Бюл. № 28.
49. Переливание крови. Операция. Основы травматологии: Учебное пособие для студентов для аудиторной работы по общей хирургии / В.А. Белобородов, Е.А. Кельчевская, И.Ю. Олейников; под ред. проф. В.А. Белобородова – Иркутск: Тип. Иркутского гос. мед. ун-та, 2011. – 64 с.
50. Пичугин Ю.И. Итоги и перспективы поиска новых эндоцеллюлярных криопротекторов // Проблемы криобиологии. – 1993, № 2. – С. 10.
51. Перехрестенко П.М., Когут Г.И., Глухенькая Г.Т. Методические рекомендации: Заготовка криоконсервированных гемопоэтических клеток хордовой крови для клинического применения. Киев. – 1998. – 11 с.
52. Полушина Т.В., Простакова Т.М., Башко Н.А. Протившоковый кровезаменитель на основе оксиэтилированного крахмала.- Проблемы гематологии и переливания крови. – 1980. – т. 25, № 3. – С.40–45.
53. Приказ Минздрава СССР от 30.12.1983 № 1509 «О дальнейших мерах по совершенствованию порядка оформления разрешения к медицинскому применению и передачи для промышленного производства новых лекарственных средств». М. – 1983.
54. Пушкарь Н.С., Белоус А.М. Введение в криобиологию. – Киев: «Наукова думка», 1975.- 343 с.
55. Пушкарь Н.С., Шраго М.Н., Белоус А.М. и др. Криопротекторы. Киев: Наукова думка, 1978. – 204 с.
56. Руководство по трансфузионной медицине [Под ред. Е.П.Сведенцова]. – Киров, 1999. – 716 с.
57. Руководство по общей производственной и клинической трансфузионной медицине. Изд. 2-е, изм. и доп. [Под ред. Е.П. Сведенцова]. – М.: Медицинская книга, 2012. – 618 с.
58. Сведенцов Е.П. Получение и криоконсервирование костного мозга для клинического применения: Автореф: дисс. док. мед. наук. – Л., 1987. – 45 с.
59. Сведенцов Е.П., Девятьярова О.Н., Туманова Т.В., Щеглова О.О., Костяев А.А., Утемов С.В. Введение лейкоцитов в холодовой анабиоз (-20°C) по экспоненциальной программе // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2005. – №3. – С. 558–566.
60. Сведенцов Е.П. Криоконсерванты для живых клеток.- Сыктывкар, 2010. – 80 с.
61. Техническое руководство Американской ассоциации банков крови (ааВВ). Перевод с англ. [Под ред. Заслуженного деятеля науки РФ, проф. Ю.Н.Токарева]. 12 изд., ESTM, 2000; авторы: Венгелен Тайлер В., Бенсон К., Бран Р.Д. и др.- 1056 с.
62. Тимакова Л.А. Колониеобразующая способность клеток консервированного костного мозга человека после длительного (до 16 лет) хранения при ультранизких температурах // Проблемы гематологии и переливания крови, 1982. – Т. 27. – № 4. – С.17–18.
63. Тимакова Л.А. Биологическая полноценность млекопитающих, длительно хранившихся при ультранизких температурах: Автореф: дис. ... канд. биол. наук. – М., 1984. – 22 с.
64. Трошина В.М., Абезгауз Н.Н., Леонтович В.А. Применение диметилацетамида в качестве криопротектора при замораживании гранулоцитов // Проблемы гематологии и переливания крови. 1977. – №5. – С.50–53.
65. Тюрин Р.В. Криоконсервирование костного мозга под защитой 3 % раствора диметилацетамида: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – СПб., 1996. – 25 с.
66. Утемов С.В. Низкотемпературное (-80°C) консервирование лейкоцитных концентратов (экспериментальное исследование): Автореф: дис. ... канд. мед. наук. – СПб., 2005. – 23 с.
67. Ушаков С.Н., Давиденков В.В., Богомолова Л.Г. и др. О синтезе поливинилпирролидона и его полимеров для плазмозамещающего раствора // Актуальные вопросы переливания крови, 1954, в. 3. – С.107–111.
68. Федотенков А.Г. Консервирование костного мозга для клинических целей: Автореф: дис. ... д-ра мед. наук. – М., 1967. – 43 с.
69. Федотенков А.Г., Суханова Л.И., Шишкина И.Д. и др. Консервирование костного мозга при низких температурах (-70°C) с применением 15% глицерина для клинических целей // Методические рекомендации. – М., 1974. – 13 с.
70. Федотенков А.Г., Шишкина И.Д., Данилова Л.А., и др. Ограждающие растворы для криоконсервирования костного мозга // Гематология и трансфузиология. – 1992. – Т.37, № 7–8. – С. 13–15.
71. Фефелова И.В., Мхеидзе Д.М., Селидовкин Р.Д. и др. Криоконсервирование тромбоцитов с диметилсульфоксидом // Гематология и трансфузиология. – 1991. – № 6. – С. 30–32.
72. Франкс Ф. Вода и водные растворы при температурах ниже 0°C / Пер. с англ.; под ред. Ф. Франкс. – Киев: Наукова думка. – 1985. – 387 с.
73. Холодный А.Я., Габалов А.А., Турбина И.Л. Лечение лучевых повреждений кровотоков у больных раком гениталий методом трансплантации посмертного костного мозга// Восстановительные и компенсаторные процессы при лучевых поражениях. – Л., 1973. – С. 49–50.
74. Холодный А.Я., Дыгин В.П., Филев Л.В. и др. Морфологическая и функциональная полноценность посмертного костного мозга через 6 лет хранения в жидком азоте // Трансплантация костного мозга в клинической практике. – М., 1984. – С. 88–89.
75. Цуцаева А.А., Аграненко В.А., Федорова Л.И. и др. Криоконсервирование клеточных суспензий / [под ред. А.А. Цуцаевой]. Киев: Наукова думка. -1983.- 240 с.
76. Чуйко В.Л. Механизмы криозащитной эффективности и фармакологические свойства ДМСО // Криобиология. – 1989, № 1. – С. 3–10.
77. Черненко Г.Т. Кровезаменители и их медицинское применение // В кн.: Руководство по трансфузионной медицине / [Под ред. Е.П.Сведенцова]. – Киров, 1999. – С.630–641.
78. Шостаковский М.Ф., Васильев П.С. Сидельковская Ф.П. и др. Синтетический плазмозамещающий препарат поливинилпирролидон // Современные проблемы гематологии и переливания крови. – 1959, в.3. – С. 91–97.
79. Шраго М.И., Тимченко В.Г., Бредихина Л.П. и др. Низкотемпературное консервирование эритроцитов с криопротектором полиэтиленоксидом // Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических структур. – Киев: «Наукова думка», 1977. – С. 47–48.
80. Шраго М.И., Гучок В.М., Калугина Ю.И., Калинин Л.А. О некоторых путях создания криопротекторов // Пробл. Гематол. и трансфузиологии. – 1981. – Т.26; №3. – С. 8–12.
81. Яленский А.Ю. Функциональное состояние тромбоцитов, вышедших из криоанабиоза (-40°C): Автореф: дис. канд.мед.наук. – Киров, 2007. – 20 с.
82. Anderson K.C., Harris R.W., Chen K.K. Toxicological studies on synthetic glycerin // J. Amer. Assoc. Sci. 1950. Vol. 39, №8. – P. 583–586.
83. Ashwood-Smith M.G. Preservation of mouse bone marrow at -79oC with dimethylsulphoxide. – Nature. – 1961. – V. 180, № 4778. – P. 1204–1205.
84. Ashwood-Smith M.J., Warby C., Connor R.W., Becker G. Low temperature preservation of mammalian cells in tissue culture with polyvinylpyrrolidone (PVP), de[trans and hydroxyethyl starch (HES). – Cryobiology, 1972, 9, № 5. – P. 444–449.
85. Bautron P., Kaufmann A. Stability of the amorphous state in the aystem water-glycerol ethylene glycol.- ibid., 1979, 16, N 1. – P. 83–89.

86. Bricka M., Bessis M. Sur la conservation des erythrocytes par congelation a basse temperature en presence de polivinylpyrrolidone et dextran. - C. r. Soc. boil., 1955, 149, №6. - P. 875-877.
87. Crowley J.R., Rene A., Valery R.C. The recovery, structure and function of human blood leukocytes after freeze-preservation // *Cryobiology*. 1974. Vol.11, №3. - P. 395-409.
88. Djurassi I., Roy A., Kim J., Cavisn J. Demethylacetamide, a New Cryoprotective Agent for Platelets // *Transfusion*. 1971. Vol. 11, № 2. - P.72-76.
89. Feinman H.M., Ben M., Lein R. Toxicology of DMSO in primate // *Pharmacologist*. - 1964. - V.6, № 1. - P. 188-193.
90. Kesler C.C., Hjermstad E.T., Synthesis of hydroxyethyl starch. - In: *Methods in carbohydrate chemistry* / Ed. Royal Whistler. New York : Acad. Press, 1964 - P. 304-306.
91. Laroche V., McKenna D., Moroff G., Schierman T., Kadidlo D., McCullough J. Cell loss and recovery in umbilical cord blood processing: a comparison of postthaw and postwash samples // *Transfusion*. 2005. Vol.45, №12. - P. 1909-1916.
92. Lovelock F. The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. - *Biochem. J.*, 1954, 56, № 3. - P. 265-270.
93. Lovelock F., Bishop M.W. Prevention of freezing damage to living cells by DMSO. - *Nature*, 1959. - V. 183, № 4666. - P. 1394-1395.
94. Maryman H.T. Cryoprotective agents: A review // *Cryobiology*. - 1971. - V.3, №2. - P. 173-183.
95. Makino M., Baba M. A cryopreservation method of human peripheral blood mononuclear cells for efficient production of dendritic cells // *Scand. J. Immunol.* 1997. Vol.45. - P.618-622.
96. Maximov N.A. Chemische Schutzmittel der Pflanzen gegen Erfrieren // *Ber. Dtsch. Ges.*, 1912. - Bd.30. - P. 52-65, 293-305, 504-516.
97. Maryman H.T. Cryoprotective agents: A review // *Cryobiology*. - 1971. - V.3, № 2. - P.173-183.
98. Valery C.R., Pivacek L.E., Gray A.D. et al. The safety and therapeutic effectiveness of human red cells stored et -80oC for as 21 years // *Transfusion*. - 1989. - V.29. - P. 429-437.
99. Holtz G.C., Davis R.B. Inhibition of human platelet aggregation by dimethylsulphoxide, dimethylacetamide and sodium glycerophosphate // *Soc. Exp. Biol. And Med.* - 1972. - V.141, №2. - P. 24.
100. Huggins C.E. Preservation of hemolysis of large volumes of red blood cells slowly frozen and thawed in the presence of dimethylsulphoxide // *Transfusion*. - 1963. - V.3, № 4. - P. 557-558.
101. Pegg D.E. Storage of human bone marrow low temperatures and its clinical application // *Int. Surg.* - 1967. - Vol.48, №3. - P. 214-220.
102. Persidsky M.D., Richards V., Leef J. Volume changes in bone marrow and Ehrlich cells after freezing as index of preservation efficiency // *Cryobiology*. - 1966. - V.3, № 1. - P.59-62.
103. Pushkar N.S., Itkin Yu.A., Bronshtein V.L. On the problem of dehydration and intracellular crystallization during freezing of cell suspension // *Cryobiology*. - 1976. - Vol. 13, N2. - P. 147-152.
104. Rosenbaum E.E. Klinische Erfahrungen mit der Anwendung von DMSO // *DMSO-Symposium*, Vienna, 1966, Berlin, 1966. - P. 47-48.
105. Rowe A., Cohen E. Phagocytic activity and antigenicity of leukocytes preserved with DMSO at a cryogenic temperature (-196°C) // *Vox. Sang.*, 1965. V.10, №3. - P. 382-384.
106. Sloviter H.A. Recovery of human red blood-cells after freezing // *Lancet*. - 1951. - V.1. - P.823824.
107. Sloviter H.A. A method for preparing thawed erythrocyte-glycerol mixtures for transfusion // *Amer. J. Med. Sci.* - 1956. - V.231, № 4. - P.437-440.
108. Takahashi T., Hirsh A. Calorimetric studies of the state of water in deeply frozen human monocytes // *Biophys. J.* 1985. Vol. 47, № 3. - P. 373-380.