

УДК 547.42/43:547.569.2:577.336:576.311.332/336

А.Н. Худяков<sup>1\*</sup>, Т.В. Полежаева<sup>1</sup>, О.О. Зайцева<sup>1</sup>,  
Д.С. Лаптев<sup>1</sup>, О.Н. Соломина<sup>1</sup>, А.А. Костяев<sup>2</sup>

## Влияние криозащитных растворов и их компонентов на интенсивность процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантную активность лейкоцитов при криоконсервировании

UDC 547.42/43:547.569.2:577.336:576.311.332/336

A.N. Khudyakov<sup>1\*</sup>, T.V. Polezhaeva<sup>1</sup>, O.O. Zaitseva<sup>1</sup>,  
D.S. Laptev<sup>1</sup>, O.N. Solomina<sup>1</sup>, A.A. Kostyaev<sup>2</sup>

### Effect of Cryoprotective Solutions and Their Components on Intensity of Lipid Peroxidation and Antioxidant Activity in Leukocytes at Cryopreservation

**Реферат.** Методом хемилюминесценции установлено, что после добавления криопротекторов 1,2-пропандиола (21%, здесь и далее начальные концентрации, смешивание в соотношении 1:1) и диметилсульфоксида (8%) к суспензии лейкоцитов в клетках снижаются уровень ПОЛ и активность ферментативных систем, обеспечивающих переработку перекисей водорода. В присутствии глицерина (7%) и гексаметиленбистетрагидроксиэтилмочевины (30%) наряду с повышением ПОЛ выявлено выраженное стимулирующее влияние на антиоксидантные системы клетки. Гидроксиэтилкрахмал (5,7%) и желатин (м.м. 16 000, 7,5%) повышают ПОЛ. После хранения в комбинированных смесях криоконсервантов при температурах –10, –20 и –40°C у лейкоцитов отмечено преобладание активности антиоксидантных систем на фоне стабильных показателей ПОЛ, что, вероятно, обеспечивало сохранность морфофункциональных показателей более чем у 75% клеток.

**Ключевые слова:** лейкоциты, криопротекторы, криоконсерванты, перекисное окисление липидов, антиоксидантная активность.

**Реферат.** Методом хемилюминесценції встановлено, що після внесення криопротекторів 1,2-пропандіолу (21%, тут і надалі початкові концентрації, змішування в співвідношенні 1:1) і диметилсульфоксиду (8%) в суспензії лейкоцитів у клітинах знижуються рівень ПОЛ і активність ферментативних систем, що забезпечують переробку перекису водню. У присутності гліцерину (7%) і гексаметиленбистетрагідроксиетилмочевини (30%) поряд з підвищенням ПОЛ виявлено вірогідний стимулюючий вплив на антиоксидантні системи клітини. Гідроксиетилкрахмал (5,7%) і желатин (м.м. 16 000, 7,5%) підвищують ПОЛ. Після зберігання в комбінованих сумішах криоконсервантів при температурах –10, –20 та –40°C в лейкоцитах спостерігали активацію антиоксидантних систем на фоні стабільних показників ПОЛ, що, імовірно, забезпечує збереженість морфофункціональних показників більше ніж у 75% клітин.

**Ключові слова:** лейкоцити, криопротектори, криоконсерванти, перекисне окислення ліпідів, антиоксидантна активність.

**Abstract.** Using chemiluminescence method it was shown that after addition of several cryoprotectants 1,2-propane diol (21% initial concentration hereinafter and added 1:1) and dimethyl sulfoxide (8%) to leukocyte suspension the level of LPO and antioxidant activity decreased. Presence of glycerol (7%) and hexa-methylene bis-tetra hydroxyethyl urea (30%) resulted in simultaneous stimulation of LPO and antioxidant systems. Hydroxyethylated starch (5.7%) and gelatine (molecular weight of 16,000; 7.5%) increase LPO. After storage in combined cryoprotective media at –10, –20 and –40°C the leukocytes revealed the activation of antioxidant systems on the background of stable LPO indices, that, probably, contributed to morphofunctional preservation of 75% of cells.

**Key words:** leukocytes, cryoprotectants, cryopreservatives, lipid peroxidation, antioxidant activity.

<sup>1</sup>ФГБУН Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук  
<sup>2</sup>ФГБУН Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА России

\*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
610027 г. Киров, а/я 1982  
тел.: +7-961-563-55-52  
электронная почта: ddic@yandex.ru

<sup>1</sup>Physiology Institute at the Scientific Center affiliated to the Ural branch of the Russian Academy of Sciences, Kirov, Russia  
<sup>2</sup>Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Kirov, Russia

\* To whom correspondence should be addressed:  
Russia 610027, Kirov, Postbox 1982  
tel.: +7 961 563 55652  
e-mail: ddic@yandex.ru

В процессе приспособления клеток к изменяющимся условиям внешней среды ведущую роль играет ферментативная антиоксидантная система. Лимитируемые данной системой процессы перекисного окисления (ПОЛ) весьма чувствительны к присутствию в биологической системе таких веществ экзогенного происхождения, как криопротекторы [5]. В то же время современные технологии криоконсервирования различных органов и тканей невозможны без использования указанных веществ, нивелирующих повреждающее действие отрицательных температур. В качестве компонентов криозащитных растворов активно используются протекторы экзо- и эндоцеллюлярного действия, мембранопротекторы, антиоксиданты и антигипоксанты. Следует отметить, что в настоящее время широкое распространение получили комбинированные криозащитные растворы, которые содержат в своём составе два или более криопротектора, а также вспомогательные вещества [2, 7]. Комбинированные среды способствуют стабилизации фракций воды, образованию мелкокристаллического льда, снижению эффекта гиперконцентрации солей и т.д. Однако их использование может не только положительно сказаться на сохранности клеток. Согласно данным литературы [8] в присутствии ряда криопротекторов отмечается увеличение интенсивности ПОЛ, которое зависит от вида вещества, его концентрации и времени экспозиции в нем клеток. Охлаждение и отогрев оказывают дополнительное влияние на повышение интенсивности процессов ПОЛ, что приводит к изменению состояния липидного бислоя клеточных мембран и нарушению структурных и функциональных систем клетки: ионных насосов, мембранных ферментов и т. д. Следовательно, при подборе ингредиентов сложных консервантов необходимо учитывать их воздействие на уровень ПОЛ клеток.

Цель данного исследования – оценка влияния криозащитных растворов и их компонентов на интенсивность процессов ПОЛ и антиоксидантную активность (АОА) лейкоцитов при криоконсервировании.

### Материалы и методы

В работе было использовано 25 лейкоцитных концентратов, полученных из цельной крови доноров-добровольцев путем цитафереза. Средний объем суспензии составлял  $14 \pm 2,6$  мл. Суспензии лейкоцитов (в течение первых 30 мин после их выделения из циркулирующей крови) смешивали в пластиковой пробирке в соотношении 1:1 с одним из растворов исследуемых веществ или их комбинаций и выдерживали при комнатной температуре. Экспозиция составляла 1 мин для криопротекторов эндоцеллюлярного действия: глицерина

The enzymatic antioxidant system plays an important role when the cells are adapting to environmental conditions. Limited by this system processes of lipid peroxidation (LPO) are quite sensitive to the presence of such substances of exogenous nature as cryoprotectants in biological system [5]. At the same time, the conventional technologies of cryopreservation of various organs and tissues are impossible without mentioned substances, which neutralize the damaging impact of low temperatures. Protectants of exo- and endocellular type of action, membrane protectants, antioxidants and antihypoxants are applied as the components of cryoprotective solutions. It is worth noting that currently the combined cryoprotecting solutions containing two or more protectants as well as other supplements are widely spread [2, 7]. Combined media stabilize water fractions, contribute to fine-crystal ice formation, decrease the effect of hyper-concentration of salines *etc.* However, their use may not only positively influence the cell survival. According to some data [8] in the presence of several cryoprotectants the increase in LPO intensity was noted, it depended on the type of substance, its concentration and exposure time of the frozen cells in it. Cooling and thawing have an additional effect on the rise of intensity of lipid peroxidation inducing the change in the state of lipid bilayer of cell membranes and disorder of structural and functional cell systems, ionic pumps, membrane enzymes *etc.* Therefore when selecting the ingredients of complex preservatives one should consider their impact on the level of cell LPO.

The goal of the research was to assess the influence of cryoprotective solutions and their components on intensity of LPO and antioxidant activity (AOA) in leukocytes during cryopreservation.

### Materials and methods

We used 25 leukocyte concentrates derived from the whole blood of volunteer donors by cytapheresis. Average volume of suspension made  $14 \pm 2.6$  ml. Leukocytes (during 30 min after procurement) were mixed in plastic tube in 1:1 ratio with one of the studied substances or their combinations and incubated at the room temperature. Exposure lasted 1 min in the case of cryoprotectants of endocellular type of action: glycerol (7%, hereinafter the initial concentrations of the substances are shown in % (v/v) if other not stated), dimethyl sulfoxide (DMSO, 8%), 1,2-propane diol (1,2-PD, 21%) or with stabilizing substances antihypoxant and antioxidant hydroxymethylethylpyridine succinate (OMEPS, 0.15, 0.3%) and antihypoxant sodium fumarate (2.8% w/w); 20 min in the case of cryoprotectant of mixed type of action hexa-methylene bis-tetrahydroxyethyl urea (HMBTOEU, 30%) or with protectants of exocellular type of action: gelatin with molecular weight of 20,000 (7.5%), hydroxyethyl starch (HES,



(7%, здесь и далее указаны начальные концентрации веществ в растворе в объемных %, если не указано иное), диметилсульфоксида (ДМСО, 8%), 1,2-пропандиола (1,2-ПД, 21%) или стабилизирующих веществ антигипоксанта и антиоксиданта сукцината гидроксиметилэтилпиридина (ОМЭПС; 0,15%, 0,3%) и антигипоксанта фумарата натрия (2,8% вес.); 20 мин – для криопротектора смешанного действия гексаметиленбистетрагидроксиэтилмочевины (ГМБТОЭМ; 30%) или криопротекторов экзоцеллюлярного действия: желатина с молекулярным весом 20 000 (7,5%), гидроксиэтилкрахмала (ГЭК; 5,7%). Время экспозиции клеток с комбинированными растворами при комнатной температуре составляло 20 мин. В качестве таких использовали следующие смеси: глицерин (7%) + желатин (7,5%) + ОМЭПС (0,3%); ГМБТОЭМ (28%) + ОМЭПС (0,15%); ГМБТОЭМ (30%) + фумарат натрия (2,8%).

На биохемилуминометре БХЛ-07 (ЦНИЛ НГМА; «ИМБИО», Россия) регистрировали: максимальную интенсивность быстрой вспышки  $I_{max}$  мВ (отражает потенциальную способность биологического объекта к свободно радикальному окислению); светосумму за 30 с  $S$  (мВ×с) (площадь под кривой свечения пробы отражает содержание радикалов  $RO_2$ , соответствующих обрыву цепи свободнорадикального окисления, показатель дает возможность оценить систему ПОЛ-АОА). Антиоксидантный потенциал пробы коррелирует с тангенсом угла наклона кривой интенсивности излучения и оси времени  $tg(-2\alpha)$  (характеризует максимальную крутизну спада кривой, со знаком минус); а также с коэффициентом  $a = S/I_{max} \times t$  (безразмерный параметр, характеризующий полную относительную интенсивность излучения за время измерения) и с коэффициентом  $Z = S/I_{max}$  – нормированной светосуммой за время измерения. Чем выше показатель  $tg(-2\alpha)$ , тем выше АОА (скорость снижения концентрации перекиси водорода в клеточной среде) в исследуемой пробе и, наоборот, чем выше  $a$  и  $Z$ , тем ниже АОА.

В измерительную кювету прибора вносили 0,1 мл лейкоцитного концентрата и 0,4 мл фосфатного буфера (рН 7,5), добавляли 0,4 мл 0,01 мМ раствора сульфата железа (ОАО «Спектр-Хим», Россия) и помещали в измерительное гнездо. Затем в кювету быстро вносили 0,2 мл 2%-го раствора перекиси водорода (ЗАО «СП Химпром», Россия) и регистрировали сигнал хемилуминесценции (ХЛ) в течение 30 с.

Согласно ранее полученным результатам [10–12] охлаждение клеток проводили по нелинейным программам до  $-10$ ,  $-20$  и  $-40^\circ\text{C}$ ; после хранения при указанных температурах соответственно в течение 9, 21, 30 суток биообъект отогревали на

5.7%). Duration of cell exposure in combined solutions at room temperature was 20 min. As the combined solutions we used the following mixtures: glycerol (7%) + gelatin (7.5%) + OMEPS (0.15%); HMBTOEU (30%) + sodium fumarate (2.8%).

By means of biochemoluminometer BHL-07 (Central Scientific Research Laboratory of Nizhny Novgorod State Medical Academy; ImBio, Russia) we recorded: the maximal intensity of quick flash  $I_{max}$ , mV (reflects a potential capacity of biological object for free radical oxidation); light sum for 30 sec  $S$ , mV×sec (area under the curve of probe luminescence reflects the content of  $RO_2$  radicals corresponding to quenching of free radical oxydation (FRO) chain, the index allows to assess the LPO-AOA system). Antioxidant potential of probe correlates with the slope of luminescence intensity curve slope and time axis  $tg(-2\alpha)$  (it characterizes maximal negative rate of rise of curve slope), as well as with coefficient  $a = S/I_{max} \times t$  (non-dimensional parameter characterizing full relative intensity of luminescence during measuring), and with coefficient  $Z = S/I_{max}$  which represents a normalized light sum during measuring. The higher index  $tg(-2\alpha)$  the higher AOA (the rate of decrease of hydrogen peroxide concentration in the cell) in the studied probe and *vice versa*, the higher  $a$  and  $Z$  the lower AOA.

To do the measurements we introduced 0.1 ml of leukocyte concentrate and 0.4 ml of phosphate buffer (pH 7.5), supplemented with 0.4 ml of 0.01 mM ferric sulfate (JSC Spektr-Khim, Russia) into the well of the chemiluminometer. Then 0.2 ml of 2% hydrogen dioxide (Khimprom, Russia) was added and chemiluminescence signal recorded for 30 sec.

Basing on the previous experiments [10–12] the cells were cooled by non-linear programs down to  $-10$ ,  $-20$  and  $-40^\circ\text{C}$ . After storage at the mentioned temperatures during 9, 21 and 30 days, correspondingly, the biospecimen was thawed in water bath ( $38^\circ\text{C}$ ). We calculated the number of cells in Goryaev's chamber, determined their morphological composition by leukogram, assessed the barrier properties of leukocyte plasmatic membranes by eosin test, phagocytic activity of neutrophils using latex inert particles.

The obtained data were statistically processed using Wilkinson's criterion [4].

## Results and discussion

The study of the role of cryoprotectants and cryopreservative solutions in the mechanisms of defense existing in the cells and tissues against cytotoxic action of free radicals appeared at cold stress is of importance for contemporary cryobiology. It was shown in the fragments of porcine spleen and liver tissues [3, 9] that how the cryoprotectants (DMSO, glycerol, PEG-400, PEG-1500) affect AOA in the cell depended on concentration of the mentioned substances and on the



водяной бане (38°C) и подсчитывали количество клеток в камере Горяева, определяли их морфологический состав по лейкоформуле, оценивали барьерные свойства плазматических мембран лейкоцитов в пробах исключения эозина, фагоцитарную активность нейтрофилов с применением инертных частиц латекса.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием критерия Уилкоксона [4].

### Результаты и обсуждение

Изучение роли криопротекторов и криоконсервантов в механизмах защиты клеток и тканей от цитотоксического действия образующихся при холодном стрессе свободных радикалов является важным в современной криобиологии. На примере фрагментов тканей селезенки и печени свиньи показано [3, 9], что степень антиоксидантного влияния криопротекторов (ДМСО, глицерина, ПЭГ-400, ПЭГ-1500) зависит от концентрации криозащитных веществ и от времени экспозиции в них биообъектов. Установлено [8], что низкомолекулярные криопротекторы приводят к снижению устойчивости митохондриальных мембран к ПОЛ после их охлаждения до -196°C и последующего нагрева до 37°C в ряду ДМСО > ПД > глицерин (при их содержании в суспензии митохондрий печени крыс выше 30 масс %). Снижение количества гидроперекисей в отогретых митохондриальных суспензиях выявлено в присутствии глицерина и 1,2-ПД в концентрациях 5 и 10 масс %.

В представленной работе исследовано влияние присутствия некоторых веществ на состояние процессов ПОЛ и антирадикальной защиты у лейкоцитов: криопротекторов с различной массой молекул (1,2-ПД – м.м. 76, ДМСО – 78, глицерин – 92, ГМБТОЭМ – 378, желатин – 16 000, ГЭК – 200 000); антигипоксантов и антиоксидантов (фумарата натрия – м.м. 160; ОМЭПС – 255); некоторых комбинаций указанных веществ, обеспечивающих, согласно ранее полученным данным [10–12], морфофункциональную сохранность более 75% клеток (глицерин + желатин + ОМЭПС и хранение при -10°C в течение 9 суток; ГМБТОЭМ + ОМЭПС – при -20°C в течение 21 суток; ГМБТОЭМ + фумарат натрия – при -40°C в течение 30 суток). Необходимо отметить, что выбранные температуры обычно являются «промежуточными» степенями для хранения при -196°C и до настоящего времени не получили широкого практического применения.

Также определены параметры ПОЛ и АОА у лейкоцитов после низкотемпературного хранения с использованием описанных выше комбинированных растворов при указанных температурах.

duration of exposure of the specimens in the solutions. It was found [8] that low-molecular cryoprotectants resulted in the decreased stability of microsomal membranes against LPO after cooling down to -196°C and following heating upto 37°C in the row DMSO > PD > glycerol (their concentration in the rat liver microsomes suspension made 30% w/w and higher). The decreased content of hydroperoxides in thawed microsomes suspensions was found if glycerol and 1,2-PD were present in the concentrations of 5 and 10% w/w.

The present investigation deals with elucidation of the effect of some substances on the state of LPO and anti-radical defense in leukocytes: cryoprotectants with different molecular weight (1,2-PD with molecular weight of 76; DMSO of 78; glycerol of 92, HMBTOEU of 378; gelatin of 16000 and HES of 200000); antihypoxants and antioxidants (sodium fumarate with molecular weight of 160 and OMEPS of 255); several combinations of mentioned substances providing which, as shown earlier [10–12], provided the preservation of morphofunctional state of more than 75% cells (glycerol + gelatin + OMEPS and storage at -10°C during 9 days; HMBTOEU + OMEPS and storage at -20°C during 21 days; HMBTOEU + sodium fumarate and storage at -40°C during 30 days). These temperatures are not widely used presently and are the transient steps for storage at -196°C.

Moreover, we have established some parameters of LPO and AOA in leukocytes after low temperature storage using the mentioned combined mixtures and stated temperatures.

We have established (Table 1) that incubation of leukocytes in the studied solutions (except sodium fumarate) induced the changes of LPO and AOA indices, and the latter in higher extent.

Basing on these data we have defined the group of cryoprotectants which along with activation of LPO stimulate the antioxidant systems of the cells: these were glycerol (7%); HMBTOEU (30%) and gelatin (7.5%).

Presence of 1,2-PD (21%) and DMSO (8%) in the medium led to the decrease of LPO and AOA indices in the leukocytes. This suppression of cell metabolic activity by cryoprotectants is known as their pseudotoxic effect and entirely disappears after removal of cryoprotectant [2].

Glycerol and HMBTOEU accelerated the processes of LPO and had a pronounced stimulating effect on cell antioxidant systems. In less extent this effect is peculiar to HES and gelatin.

Antioxidant and antihypoxant OMEPS of 0.15% concentration reduced and of 0.3% increased the intensity of LPO. In both cases the inhibition of leukocyte ability to 'proceed' the peroxides was observed, whilst according to other data [1, 6] OMEPS mani-



**Таблица 1.** Влияние ингредиентов криозащитных растворов на уровень ПОЛ и антиоксидантный потенциал лейкоцитов ( $n = 7, M \pm \sigma$ )

**Table 1.** Effect of components of cryopreservative solutions on level of LPO and antioxidant potential of leukocytes ( $n = 7, M \pm \sigma$ )

Исследуемый субстрат Studied mixture	Показатели хемилуминограммы Chemiluminogram indices				
	$I_{\max}$	S	$tg(-2\alpha)$	a	Z
ЛК LC	115,0 ± 26,6	843,8 ± 142,9	26,2 ± 5,54	0,25 ± 0,02	7,5 ± 0,5
ЛК 1:1 с 1,2-ПД 21% LC 1:1 with 1,2-PD 21%	90,0 ± 4,2*	675,2 ± 18,5*	18,2 ± 0,6*	0,27 ± 0,01*	8,0 ± 0,2*
ЛК 1:1 с ДМСО 8% LC 1:1 with DMSO 8%	98,9 ± 14,1	672,2 ± 137,2*	18,1 ± 2,3*	0,23 ± 0,02	7,0 ± 0,5
ЛК 1:1 с глицерином 7% LC 1:1 with glycerol 7%	188,8 ± 66,4*	1048,0 ± 162,1*	49,2 ± 16,6*	0,19 ± 0,03*	5,8 ± 0,9*
ЛК 1:1 с фумаратом натрия 2,8% LC 1:1 with sodium fumarate 2.8%	110,5 ± 38,9	961,2 ± 284,7	21,6 ± 9,1	0,26 ± 0,02	7,8 ± 0,5
ЛК 1:1 с ОМЭПС 0,15% LC 1:1 with OMEPS 0.15%	80,5 ± 10,8*	675,2 ± 88,2*	20,9 ± 3,2*	0,26 ± 0,04	7,6 ± 0,6
ЛК 1:1 с ОМЭПС 0,3% LC 1:1 with OMEPS 0.3%	121,0 ± 7,79	1012,0 ± 140,7*	18,6 ± 3,5*	0,27 ± 0,03	8,1 ± 0,9
ЛК 1:1 с ГМБТОЭМ 30% LC 1:1 with ГМБТОЭМ 30%	180,2 ± 13,6*	1165,0 ± 162,1*	44,2 ± 4,5*	0,22 ± 0,02*	6,5 ± 0,5*
ЛК 1:1 с желатином 7,5% LC 1:1 with gelatine 7.5%	215,0 ± 14,5*	1680,0 ± 164,2*	38,5 ± 2,0*	0,26 ± 0,01	7,8 ± 0,4
ЛК 1:1 с ГЭК 5,7% LC 1:1 with HES 5.7%	166,2 ± 17,4*	1127,0 ± 76,1*	39,4 ± 4,2*	0,23 ± 0,01*	6,8 ± 0,4*

**Примечание:** \* – различие с величиной показателя лейкоцитных концентратов достоверно ( $p \leq 0,05$ ).

**Note:** \* – the difference from the value of leukocyte concentrates is significant ( $p \leq 0.05$ )

Установлено (табл. 1), что после инкубирования лейкоцитов с исследуемыми растворами (за исключением фумарата натрия) отмечается изменение показателей ПОЛ и АОА, причем последнего (характеризующего скорость снижения количества гидроперекисей в лейкоцитном концентрате) в большей степени.

На основании полученных данных обозначена группа криопротекторов, не только ускоряющих процессы липопероксидации, но и оказывающих стимулирующее действие на антиоксидантные системы клетки: глицерин (7%), ГМБТОЭМ (30%) и желатин (7,5%).

Криопротекторы 1,2-ПД (21%), ДМСО (8%) замедляют процессы ПОЛ и снижают АОА у лейкоцитов. Данное подавление метаболической активности клеток криопротекторами известно, как проявление их псевдотоксического эффекта, который устраняется при удалении протектора из клетки [2].

Антиоксидант и противогипоксант ОМЭПС при концентрации 0,15% снижает интенсивность ПОЛ, а при 0,3% – повышает ее. В обоих случаях наблюдается угнетение у лейкоцитов способности «перерабатывать» перекиси, тогда как согласно другим

festated an oxidant effect *in vivo*, stipulated by the ability to inhibit the LPO initiation caused by formation of reactive oxygen species, appearance of catalytic active ions of ferrum and decrease in activity of endogenic system of free radical oxidation inhibitors. In our research such an effect of OMEPS *in vitro* was revealed only for 0.15% concentration. Decrease of AOA in leukocytes was probably associated with the ability of this substance to block own antioxidant systems of cells, regulating the presence of hydroperoxides.

Combined action of cryoprotectant mixtures had other character of effect on LPO and AOA. For example (Table 2), after exposure in glycerol (7%) + gelatin (7.5%) + OMEPS (0.3%) the levels of LPO and AOA of leukocytes judging by the values of S, and  $tg(-2\alpha)$  decreased 1.2 and 1.8 times, respectively. This effect could positively affect on the outcome of the storage of cells at  $-10^{\circ}\text{C}$ , when the water is not crystallized and cell metabolism slows down insignificantly. After 9 days of exposure of the cells at  $-10^{\circ}\text{C}$  ( $n = 8, M \pm s$ ) in the mentioned combined solution leukocyte survival made  $84.8 \pm 10.9\%$  (of the initial level),  $83.5 \pm 6.0\%$  of cells had membrane non-permeable for vital dye eosin,  $77.2 \pm 8.8\%$  granulocytes

данным [1, 6] в условиях целого организма это вещество проявляет антиоксидантное действие, обусловленное способностью ингибировать стадию инициации ПОЛ, вызванную образованием активных форм кислорода, появлением каталитически активных ионов железа и падением активности эндогенной системы ингибиторов свободно-радикального окисления. В наших исследованиях такое действие ОМЭПС *in vitro* мы выявили только для концентрации 0,15%. Полагаем, что снижение АОА лейкоцитов, вероятно, связано со способностью данного вещества блокировать собственные антиоксидантные системы клетки, регулирующие уровень в ней гидроперексидов.

При совместном действии компонентов комбинированного криоконсерванта характер влияния на ПОЛ и АОА изменяется. Например (табл. 2), после экспозиции в растворе глицерин (7%) + желатин (7,5%) + ОМЭПС (0,3%) уровни ПОЛ и АОА лейкоцитов согласно значениям  $S$ ,  $tg(-2\alpha)$  снижаются в 1,2 и 1,8 раза, что свидетельствует о подавлении метаболической активности клеток. Данный эффект может иметь положительное значение при хранении клеток при температуре  $-10^{\circ}\text{C}$ , при которой вода в данном растворе еще не кристаллизуется и метаболизм в клетке замедлен незначительно. После 9 суток хранения клеток при  $-10^{\circ}\text{C}$  в указанном комбинированном растворе сохраняется  $84,8 \pm 10,9\%$  (от исходного количества) лейкоцитов, из них  $83,5 \pm 6,0\%$  клеток имеют мембрану, непроницаемую для витального красителя эозина, сохранилось  $77,2 \pm 8,8\%$  гранулоцитов, а у  $72,6 \pm 3,8\%$  нейтрофилов наблюдали способность к фагоцитозу. При увеличении сроков хранения указанные показатели жизнеспособности клеток существенно ухудшаются. Мы полагаем, что это связано с ростом ПОЛ: через 9 суток хранения при  $-10^{\circ}\text{C}$  интенсивность ПОЛ у лейкоцитов статистически значимо увеличивается в 1,2 раза, а АОА – в 1,5 раза, однако оба параметра не превышают таковые у клеток, не подвергнутых какому-либо воздействию.

Таким образом, использование глицерина совместно с желатином и ОМЭПС позволяет

**Таблица 2.** Показатели хемилюминограммы лейкоцитов ( $n = 8$ ,  $M \pm \sigma$ ) после низкотемпературного хранения при  $-10^{\circ}\text{C}$  в течение 9 суток под защитой комбинированного криоконсерванта (глицерин 7%, желатин 7,5% и ОМЭПС 0,3%)

**Table 2.** The indices of chemiluminogram of leukocytes ( $n = 8$ ,  $M \pm \sigma$ ) after low temperature storage at  $-10^{\circ}\text{C}$  under protection of combined cryopreservative containing glycerol (7%), gelatin (7.5%) and OMEPS (0.3%) during 9 days

Этап Stage	Показатели хемилюминограммы Chemiluminogram indices				
	$I_{\max}$	$S$	$tg(-2\alpha)$	$a$	$Z$
До воздействий Before treatment	$118,2 \pm 10,8^*$	$773,2 \pm 14,02^*$	$28,9 \pm 3,9^*$	$0,22 \pm 0,02^*$	$6,6 \pm 0,5^*$
После инкубации с консервантом After incubation with preservative	$95,4 \pm 2,2$	$639,8 \pm 7,12$	$16,2 \pm 0,1$	$0,29 \pm 0,004$	$8,8 \pm 0,1$
После оттаивания Post thaw	$111,8 \pm 12,5^*$	$759,8 \pm 71,8^*$	$24,1 \pm 3,7^*$	$0,23 \pm 0,02^*$	$6,8 \pm 0,5^*$

**Примечание:** \* – различие с величиной показателя после инкубации с консервантом достоверно ( $p \leq 0,05$ ).  
**Note:** \* – the difference from the value after incubation with preservative is significant ( $p \leq 0.05$ )

were preserved, in  $72.6 \pm 3.8\%$  neutrophils preserved the ability to phagocytosis. During further storage the mentioned indices of cell viability significantly decreased. We suggest that this was associated with the increase of LPO: in 9 days of storage the LPO intensity in leukocytes increased 1.2 times, and AOA did 1.5 times, both parameters did not exceed ones of the cells not subjected to any exposure.

Therefore the use of combined solution of glycerol, gelatin and OMEPS allowed to preserve the leukocytes in functionally valuable state at  $-10^{\circ}\text{C}$  during 9 days.

After incubation in mixture of HMBTOEU (28%) and OMEPS (0.15%) the LPO level of leukocytes did not change, and AOA increased 1.4 times (Table 3). This phenomenon also could positively affect the further survival of cells after storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  because increased AOA intensity enables neutralizing of following activation of LPO during storage and heating. The evidence for this was morphological and functional values of cells after warming in 21 days of storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ :  $90.9 \pm 7.6\%$  of leukocytes were preserved, eosin resistance was found in  $89.3 \pm 6.8\%$  of cells, the survival of granulocytes made  $93.7 \pm 9.8\%$ , the capacity to phagocytosis was observed in  $71.7 \pm 10.8\%$  of neutrophils. The analysis of LPO and AOA levels had shown no statistically significant difference from the values prior to an exposure in cryoprotective solutions attesting a stable functioning of leukocytes systems.

After the incubation in the mixture of HMBTOEU (30%) + sodium fumarate (2.8%) the LPO and AOA levels of leukocytes remained unchanged (Table 4). Similar results have been obtained after 30 days of cells storage at  $-40^{\circ}\text{C}$  in this solution. The leukocytes survival was  $84.5 \pm 10.8\%$ , eosin resistance was  $70.1 \pm 14.9\%$ ,  $62.4 \pm 4.9\%$  of granulocytes were preserved,



сохранить лейкоциты в функционально полноценном состоянии при  $-10^{\circ}\text{C}$  в течение 9 суток.

После экспозиции в смеси ГМБТОЭМ (28%) и ОМЭПС (0,15%) уровень ПОЛ лейкоцитов не изменяется, а АОА повышается в 1,4 раза (табл. 3). Данное явление может положительно сказаться на исходе хранения клеток при  $-20^{\circ}\text{C}$ , так как повышение интенсивности АОА позволяет нивелировать последующую активацию ПОЛ во время последующих этапов подготовки к хранению и отогрева лейкоцитов. Подтверждением этому могут служить морфологические и функциональные показатели клеток после отогрева через 21 сутки хранения при  $-20^{\circ}\text{C}$ : сохраняется  $90,9 \pm 7,6\%$  лейкоцитов, эозинорезистентность характерна для  $89,3 \pm 6,8\%$  клеток, сохранность гранулоцитов составляет  $93,7 \pm 9,8\%$ , способность к фагоцитозу наблюдается у  $71,7 \pm 10,8\%$  нейтрофилов. Анализ уровня ПОЛ и АОА после отогрева клеток не показал статистически значимого отличия от значений до инкубации с криопротекторным раствором, что свидетельствует о стабильной работе функциональных систем лейкоцитов.

После экспозиции клеток в смеси ГМБТОЭМ (30%) + фу-марат натрия (2,8%) уровни ПОЛ и АОА лейкоцитов остаются без изменений (табл. 4). Аналогичные результаты получены после 30 суток хранения клеток при  $-40^{\circ}\text{C}$  в данном растворе. Сохранность лейкоцитов составляет  $84,5 \pm 10,8\%$ , эозинорезистентность отмечена у  $70,1 \pm 14,9\%$  клеток, сохранилось  $62,4 \pm 4,9\%$  гранулоцитов, способность к фагоцитозу отмечена у  $92,2 \pm 6,4\%$

**Таблица 3.** Показатели хемилуминограммы лейкоцитов ( $n = 6, M \pm \sigma$ ) после низкотемпературного хранения при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 21 суток под защитой комбинированного криоконсерванта (ГМБТОЭМ 28% и ОМЭПС 0,15%)

**Table 3.** The indices of chemiluminogram of leukocytes ( $n = 6, M \pm \sigma$ ) after low temperature storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  under protection of combined cryopreservative containing HMBTOEU (28%) and OMEPS (0.15%) during 21 days

Этап Stage	Показатели хемилуминограммы Chemiluminogram indices				
	$I_{\max}$	S	$\text{tg}(-2\alpha)$	a	Z
До воздействий Before treatment	$117,7 \pm 20,3$	$899,3 \pm 181,5$	$23,4 \pm 2,2^*$	$0,25 \pm 0,01^*$	$7,6 \pm 0,2^*$
После инкубации с консервантом After incubation with preservative	$139,0 \pm 30,6$	$939,7 \pm 150,3$	$32,9 \pm 7,0$	$0,22 \pm 0,01$	$6,6 \pm 0,4$
После оттаивания Post thaw	$158,0 \pm 27,4$	$1022,0 \pm 182,6$	$30,9 \pm 3,9$	$0,22 \pm 0,005$	$6,5 \pm 0,2$

**Примечание:** \* – различие с величиной показателя после инкубации с консервантом достоверно ( $p \leq 0,05$ ).  
**Note:** \* – the difference from the value after incubation with preservative is significant ( $p \leq 0.05$ )

the ability to phagocytosis was noted in  $92.2 \pm 6.4\%$  of neutrophils. Therefore, the combination of HMBTOEU with sodium fumarate induced the stabilization of LPO-AOA system state during cryopreservation leading to the highest preservation of functional activity of nucleated cells.

It could be concluded that estimation of the effect revealed by cryoprotectants in terms of LPO and AOA in the cells could be used as a prognostic index for development of low temperature storage methods.

Basing on the obtained as well as previously reported data we can suppose that the choice of concentration of cryoprotectant which would not affect the

**Таблица 4.** Показатели хемилуминограммы лейкоцитов ( $n = 5, M \pm \sigma$ ) после низкотемпературного хранения при  $-40^{\circ}\text{C}$  в течение 30 суток под защитой комбинированного криоконсерванта (ГМБТОЭМ 30% и фу-марат натрия 2,8%)

**Table 4.** The indices of chemiluminogram of leukocytes ( $n = 5, M \pm \sigma$ ) after low temperature storage at  $-40^{\circ}\text{C}$  under protection of combined cryopreservative containing HMBTOEU (30%) and sodium fumarate (2.8%) during 30 days

Этап Stage	Показатели хемилуминограммы Chemiluminogram indices				
	$I_{\max}$	S	$\text{tg}(-2\alpha)$	a	Z
До воздействий Before treatment	$77,2 \pm 11,9$	$590,8 \pm 50,6$	$17,7 \pm 3,3$	$0,25 \pm 0,02$	$7,7 \pm 0,8$
После инкубации с консервантом After incubation with preservative	$94,0 \pm 21,6$	$674,0 \pm 99,0$	$20,4 \pm 5,7$	$0,24 \pm 0,02$	$7,2 \pm 0,7$
После оттаивания Post thaw	$101,5 \pm 12,1$	$669,5 \pm 51,6$	$24,7 \pm 3,8$	$0,22 \pm 0,02$	$6,6 \pm 0,5$

**Примечание:** \* – различие с величиной показателя после инкубации с консервантом достоверно ( $p \leq 0,05$ ).  
**Note:** \* – the difference from the value after incubation with preservative is significant ( $p \leq 0.05$ )

нейтрофилов. Следовательно, сочетание ГМБТОЭМ и фумарата натрия способствует стабилизации состояния системы ПОЛ-АОА при криоконсервировании, что приводит к наилучшей сохранности функциональной активности ядродержащих клеток.

Очевидно, оценка степени влияния криоконсервантов на ПОЛ и АОА у клеток при разработке методов криоконсервирования позволит сделать прогноз об эффективности их применения для замораживания биообъектов.

На основании известных и полученных в работе данных можно предположить, что выбор концентрации предполагаемого для использования криопротектора, не снижающей устойчивость мембран клеток к ПОЛ зависит от размера молекул (т. е. проникающей способности), времени экспозиции биообъекта, видовой специфичности биообъекта; эффективные комбинированные криоконсерванты образуют симбиотические комплексы, которые не вызывают активацию ПОЛ, но могут стимулировать антиоксидантные системы, что, возможно, способствует повышению криоустойчивости клеток; хранение ядродержащих клеток в условиях «переходных» температур (–10, –20, –40°C) в среде комбинированных консервантов, не вызывающих активацию ПОЛ, обеспечивает высокую сохранность клеток.

Необходимо отметить, что возможные механизмы участия криопротекторов в процессах ПОЛ требуют дальнейшего изучения.

### Выводы

1. ДМСО в исходной концентрации 8% и 1,2-ПД – 21% снижают интенсивность ПОЛ на мембранах лейкоцитов и их АОА, проявляя тем самым псевдотоксический эффект.

2. Присутствие в клеточной суспензии глицерина (7%), ГМБТОЭМ (30%), ГЭК (5,7%), желатина (7,5%), ОМЭПС (0,3%) приводит к снижению устойчивости мембран лейкоцитов к перекисному окислению.

3. Глицерин (7%), ГМБТОЭМ (30%) и ОМЭПС (0,15%) проявляют свойства антиоксидантов, о чем свидетельствует снижение концентрации гидрперекисей в клеточных взвесах.

4. Инкубация клеток в смеси криопротекторов и стабилизирующих веществ в используемых концентрациях: глицерин + желатин + ОМЭПС, а также ГМБТОЭМ с ОМЭПС или фумаратом натрия не вызывает активации ПОЛ в лейкоцитах.

5. Комбинированные криоконсерванты способствуют стабилизации состояния системы ПОЛ-АОА у лейкоцитов при низкотемпературном хранении (–10, –20, –40°C), что увеличивает сохранность функциональной активности ядродержащих клеток.

LPO stability of cell membranes depends on molecules dimensions (*i. e.* their permeability), duration of exposure of the biospecimen, its species specificity; effective combined cryopreservative solutions act as symbiotic systems, which do not activate LPO but stimulate anti-oxidant systems, that probably contribute to the rise in cell cryostability; storage of nucleated cells at transient temperatures (–10°C, –20°C, –40°C) in the combined cryopreservative media, which do not activate LPO, provide high cell survival.

It should be noted that possible mechanisms of how cryoprotectants affect the LPO processes necessitate further investigations.

### Conclusions

1. Addition of DMSO in 8% and 1,2-PD in 21% initial concentrations to leukocyte suspension in 1:1 ratio lowers the LPO intensity in the cell membranes and their AOA in such way manifesting the pseudotoxic effect.

2. The addition of glycerol (7%), HMBTOEU (30%), HES (5.7%), gelatin (7.5%), OMEPS (0.3%) to cell suspension in 1:1 ratio results in the decrease of resistance of leukocyte membranes to peroxidation.

3. Glycerol (7%), HMBTOEU (30%) and OMEPS (0.15%) act as antioxidants, which is confirmed by decreased hydroperoxide concentration in the cell suspensions.

4. Incubation of cells in the mixtures of cryoprotectants and stabilizers in the studied concentrations: glycerol + gelatin + OMEPS and HMBTOEU + OMEPS or sodium fumarate does not lead to activation of LPO in leukocytes.

5. Combined cryopreservative solutions contribute to stabilizations of LPO-AOA system at low temperature storage (–10°C, –20°C, –40°C), that increases the post-storage preservation of cell functions.

### References

1. Baraboy V.A. Stress mechanisms and lipid peroxidation // *Uspekhi Sovremennoi Biologii*. – 1991. – Vol. 111, Issue 6. – P. 21–28.
2. Belous A.M., Grischenko V.I. *Cryobiology*. – Kiev: Nauk. Dumka, 1994. – 431 p.
3. Galchenko S.E., Mamontova A.V., Sandomirsky B.P. Influence of modes of preservation of porcine spleen fragments on intensity of peroxidation // *Problems of Cryobiology*. – 1998. – N1. – P. 58–61;
4. Glants S. *Medical and biological statistics*. – Moscow: Praktika, 1998. – 459 p.
5. Gordiyenko A.D., Kudokotseva E.V. Study of functional state of mitochondria in cell suspensions exposed in cryoprotectant solution // *Kriobiologiya i Kriomeditsyna*. – 1980. – Issue 7. – P. 32–34.
6. Klebanov G.I., Lyubitsky O.B., Vasil'eva O.V. et al. Antioxidant properties of 3-oxypyridine derivatives: mexidol, emoxipin and proxipin // *Problemy Meditsinskoy Khimii*. – 2001. – Vol. 47, N3. – P. 288–300.





## Литература

1. Барабой В.А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов // Успехи современной биологии. – 1991. – Т.111, Вып. 6. – С. 21–28.
2. Белоус А.М., Грищенко В.И. Кробиология. – Киев: Наук. думка, 1994. – 431 с.
3. Гальченко С.Е., Мамонтова А.В., Сандомирский Б.П. Влияние режимов криоконсервирования фрагментов селезенки свиньи на интенсивность перекисных процессов // Проблемы кробиологии. – 1998. – №1. – С. 58–61.
4. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
5. Гордиенко А.Д., Кудокоцева Е.В. Изучение функционального состояния митохондрий в клеточных суспензиях, экспонированных в растворе криопротектора // Кробиология и криомедицина. – 1980. – Вып. 7. – С. 32–34.
6. Клебанов Г.И., Любичкий О.Б., Васильева О.В. и др. Антиоксидантные свойства производных 3-оксипиридина: мексидола, эмоксипина и проксилина // Вопросы медицинской химии. – 2001. – Т. 47, №3. – С. 288–300.
7. Корниенко Е.М., Бондаренко В.А. Перспективность использования комбинированных криопротекторов при замораживании компонентов крови одноступенчатым способом при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$  // Проблемы кробиологии. – 2008. – Т. 18, №2. – С. 248.
8. Онищенко Е.В., Зинченко А.В. Исследование влияния некоторых проникающих криопротекторов на микросомы методом хемилюминесценции // Проблемы кробиологии. – 2005. – Т. 15, №1. – С. 50–55.
9. Сандомирский Б.П., Гальченко С.Е., Тыныныка Л.Н. Сохранность фрагментов печени половозрелых свиней и новорожденных поросят при различных условиях криоконсервирования // Проблемы кробиологии. – 2003. – №4. – С. 77–84.
10. Сведенцов Е.П., Степанова Е.С., Туманова Т.В. и др. Применение препаратов на основе желатина при создании ограждающего раствора для консервирования лейкоцитов при температуре переохлаждения // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – Т. 144, №10. – С. 445–447.
11. Сведенцов Е.П., Туманова Т.В., Худяков А.Н. и др. Сохранение биологических мембран ядерных клеток крови при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  // Биологические мембраны. – 2008. – Т. 25, №1. – С. 23–29.
12. Svedentsov E.P., Tumanova T.V., Shcheglova O.O. et al. Freezing leukocytes to  $-40^{\circ}\text{C}$  and  $-20^{\circ}\text{C}$  under an exponential programme with original cryopreservatives // International Journal of Refrigeration. – 2006. – Vol. 29. – P. 369–373.
7. Kornienko E.M., Bondarenko V.A. Perspective in using combined cryoprotectants during blood component freezing by one-step method at  $-196^{\circ}\text{C}$  // Problems of Cryobiology. – 2008. – Vol. 18, N2. – P. 248.
8. Onischenko E.V., Zinchenko A.V. Study of effect of some permeable cryoprotectants on microsomes using chemiluminescence method // Problems of Cryobiology. – 2005. – Vol. 15, N1. – P. 50–55.
9. Sandomirsky B.P., Galchenko S.E., Tynynyka L.N. Integrity of adult pig and newborn piglets liver fragments under different cryopreservation conditions // Problems of Cryobiology. – 2003. – N4. – P. 77–84.
10. Svedentsov E.P., Stepanova E.S., Tumanova T.V. et al. Application of gelatin-based preparations at development of preventive solution for preservation of leukocytes at overcooling temperature // Bull. Eksp. Biol. Med. – 2007. – Vol. 144, N10. – P. 445–447.
11. Svedentsov E.P., Tumanova T.V., Khudyakov A.N. et al. Integrity of biological membranes of blood nucleated cells at  $-80^{\circ}\text{C}$  // Biologicheskie Membrany. – 2008. – Vol. 25, N1. – P. 23–29.
12. Svedentsov E.P., Tumanova T.V., Shcheglova O.O. et al. Freezing leukocytes to  $-40^{\circ}\text{C}$  and  $-20^{\circ}\text{C}$  under an exponential programme with original cryopreservatives // International Journal of Refrigeration. – 2006. – Vol. 29. – P. 369–373.

