

## Осмотические свойства эритроцитов, замороженных в средах с непроницаемыми и проникающими криопротекторами

UDC 57.043:612.111:547.422

V.V. RAMAZANOV\*, V.A. BONDARENKO

## Osmotic Properties of Erythrocytes Frozen in Media Containing Non-Penetrating and Penetrating Cryoprotectants

Исследовали осмотический гемолиз эритроцитов, замороженных в комбинированных криоконсервантах, содержащих полимерные непроницающие (декстран, ПЭГ) и проникающие (ДМСО, глюкоза) криопротекторы. Эритроциты, замороженные с полимерами, в интервале концентраций NaCl 0,45–0,9% имеют осмотическую устойчивость ниже, чем интактные клетки, а при концентрации NaCl 0,09–0,4% – выше. Устойчивость тем выше, чем больше концентрация полимера в среде замораживания. Комбинирование в криоконсерванте непроницающих и проникающих криопротекторов сохраняет нормальную осмотическую устойчивость замороженных эритроцитов. Полученные результаты позволяют предположить, что рост осмотической устойчивости замороженных эритроцитов в интервале концентраций NaCl 0,09–0,4% связан с нарастанием градиента концентрации полимеров на мембранах клеток при охлаждении. Комбинирование в среде замораживания проникающего криопротектора с полимером способствует положительной коррекции криопротекторной эффективности последнего вследствие ослабления осмотического стресса при замораживании, который налагается концентрированием непроницающего полимерного криопротектора.

**Ключевые слова:** эритроциты, комбинированные криоконсерванты, осмотический гемолиз.

Досліджували осмотичний гемолиз еритроцитів, заморожених у комбінованих криоконсервантах, які містять полімерні непроницаючі (декстран, ПЕГ) і проникаючі (ДМСО, глюкоза) криопротектори. Еритроцити, заморожені з полімерами, в інтервалі концентрацій NaCl 0,45–0,9% мають осмотичну стійкість нижчу, ніж інтактні клітини, а при концентрації NaCl 0,09–0,4% – вищу. Стійкість тим вища, чим більша концентрація полімеру в середовищі заморожування. Комбінування в криоконсерванті непроницаючих та проникаючих криопротекторів забезпечує підтримку нормальної осмотичної стійкості заморожених еритроцитів. Отримані результати дозволяють припустити, що зростання осмотичної стійкості заморожених еритроцитів в інтервалі концентрацій NaCl 0,09–0,4% пов'язано зі збільшенням градієнта концентрації полімерів на мембранах клітин при охолодженні. Комбінування в середовищі заморожування проникаючого криопротектора з полімером сприяє позитивній корекції криопротекторної ефективності останнього внаслідок послаблення осмотичного стресу при заморожуванні, який накладається концентруванням непроницаючого полімерного криопротектора.

**Ключові слова:** еритроцити, комбіновані криоконсерванти, осмотичний гемолиз.

Osmotic hemolysis of erythrocytes frozen in combined cryopreservatives containing polymer non-penetrating (dextran, PEG) and penetrating (DMSO, glucose) cryoprotectants was studied. Erythrocytes frozen with the polymers within the range of NaCl concentrations 0.45–0.9% are characterized by lower osmotic resistance than intact cells and by higher osmotic resistance within the range of NaCl concentrations 0.09–0.4%. The higher the polymer concentration in the freezing medium is, the higher resistance is. Combination of non-penetrating and penetrating cryoprotectants in cryopreservatives maintains normal osmotic resistance of frozen erythrocytes. The results obtained allow presuming that enhancement in osmotic resistance of erythrocytes frozen within the range of NaCl concentrations 0.09–0.4% is associated with a growth in polymer concentration gradient on cell membranes in the process of cooling. Combination a penetrating cryoprotectant with a polymer in freezing media promotes a positive correction of cryoprotective efficiency of the latter owing to weakening osmotic stress during freezing, which is caused by concentration of the non-penetrating polymer cryoprotectant.

**Key words:** erythrocytes, combined cryopreservatives, osmotic hemolysis.

Сочетание непроницающих и проникающих криопротекторов эффективно при замораживании разных клеток, включая стволовые клетки периферической крови [5, 27, 28], нефракционированные клетки костного мозга [30, 31], гранулоциты [11], лимфоциты [29], гемопоэтические клетки кордовой крови [13] и клетки поджелудочной железы человека [15]. Эти данные указывают на общие причи-

Combination of non-penetrating and penetrating cryoprotectants is efficient for freezing different cells including peripheral blood stem cells [5, 27, 28], bone marrow non-fractionated cells [30, 31], granulocytes [11], lymphocytes [29], cord blood hemopoietic cells [13] and human pancreatic cells [15]. These data indicate to common causes of injuries in different cells, which can be eliminated by combined cryoprotectants.

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

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

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-41-35, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта:  
cryo@online.kharkov.ua

\* To whom correspondence should be addressed: 23,  
Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373  
4135, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

ны повреждения разных клеток, которые устраняются комбинированными криоконсервантами.

Предполагается, что дополнительные повреждения эритроцитов при замораживании с высоким гематокритом (эффект “упаковки”) возникают вследствие механических воздействий в промерзающих каналах льда [17] и осмотических эффектов при плавлении внеклеточного и внутриклеточного льда [9, 10, 23, 24].

При медленном замораживании плотных суспензий эритроциты под влиянием растущих кристаллов льда концентрируются в каналах, подвергаются сдвиговому стрессу, сдавливаются и разрушаются [17, 21, 22]. При быстром замораживании клетки дисперсно распределяются во льду, тем не менее отрицательное влияние высокой концентрации клеток выявляется и в таких условиях. Поэтому авторы [21] заключили, что механизм дополнительного “прироста” повреждений клеток при быстром замораживании отличается от такового при медленном замораживании. Быстрое охлаждение повышает вероятность образования внутриклеточных кристаллов льда, “прирост” которых будет иметь место при замораживании эритроцитов с высоким гематокритом [23]. Предполагается, что повреждение внутриклеточными кристаллами льда может быть осмотическим вследствие их плавления при медленном размораживании [9]. При быстром размораживании увеличение степени повреждения в суспензии с высокой концентрацией клеток происходит за счет большего разведения внешней среды вследствие быстрого плавления внеклеточного льда, основная часть которого была образована из внутриклеточной воды [10]. Таким образом, при быстром замораживании-отогреве суспензий с высокой концентрацией клеток будет иметь место “прирост” осмотических повреждений на стадии отогрева.

Эффект “упаковки” устраняется не только при повышении концентрации глицерина в среде замораживания, но и при включении в криоконсервант стабилизаторов мембраны. В обоих случаях эритроциты, отмытые после замораживания, имеют нормальную осмотическую хрупкость [33].

Показано [2], что при замораживании в сахарозо-солевой среде эритроцитов с высоким гематокритом уровень их повреждения больше по сравнению с клетками, замороженными с низким гематокритом. Сочетание указанной среды с непроницаемыми криопротекторами не устраняет эффект “упаковки”, в отличие от ее комбинирования с глюкозой или проникающим криопротектором. Предполагается, что устранение повреждений, связанных с высокой концентрацией клеток в среде замораживания, определяется осмотической протекцией эритроцитов в ходе быстрого заморажива-

Additional injuries in erythrocytes, when they are frozen with high hematocrit (“packing” effect), are considered to occur owing to mechanical impacts in ice frozen canals [17] and osmotic effects during melting extracellular and intracellular ice [9, 10, 23, 24].

When dense suspensions are frozen slowly erythrocytes affected by growing ice crystals condense in canals, undergo shear stress, become compressed and disintegrate [17, 21, 22]. When cells are frozen quickly they are spread dispersively in ice, nevertheless negative influence of high concentrations of cells manifests itself under these conditions, too. That is why the authors [21] concluded that the mechanism of additional “gain” in cell injuries during quick freezing differed from that during slow freezing. Rapid chilling enhanced probability of emergence of intracellular ice crystals, the growth of which will occur when erythrocytes being frozen with high hematocrit [23]. Injuries by intracellular ice crystals are regarded to be osmotic ones due to their thawing during slow thawing [9]. During the rapid thawing the gain in injury severity in suspensions with high cell concentration occurs because of the quick of melting extracellular ice, the essential portion of which was formed from intracellular water [10]. Thus, in the process of rapid freeze-thawing of suspensions with high cell concentrations a gain in osmotic injuries at the thawing stage will take place.

The “packing” effect is eliminated not only by increasing the concentrations of glycerol in a freezing medium, but also by inclusion of membrane stabilisers to cryopreservatives. In both cases erythrocytes washed after freezing have normal osmotic fragility [33].

It was shown [2] that when erythrocytes were frozen in sucrose-salt medium with high hematocrit the level of their injuries was bigger in comparison with cells frozen with low hematocrit. Combination of the medium above-mentioned with non-penetrating cryoprotectants does not eliminate “packing” effect unlike its combination with glucose or with a penetrating cryoprotectant. Elimination of injuries associated with high concentrations of cells in freezing media is assumed to be determined by osmotic protection of erythrocytes in the process of rapid freezing-thawing, which is provided by combination of sucrose with glucose or sucrose with a penetrating cryoprotectant [2].

The aim of the work is studying the osmotic lysis of erythrocytes washed after freezing in sucrose-salt medium with non-penetrating and penetrating cryoprotectants.

## Materials and methods

NaCl (chemically pure), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (chemically pure), sucrose (analytically pure), glucose (analytically pure), polyethylene glycols with molecular weights 1500 (PEG-1500) and 2,000 (PEG-2000) produced by Merck, dextrans with molecular weights of 10,000

ния-отогрева, которая обеспечивается сочетанием сахарозы с глюкозой или сахарозы с проникающим криопротектором [2].

Цель работы – исследование осмотического лизиса эритроцитов, отмытых после замораживания в сахарозо-солевой среде с непроницаемыми и проникающими криопротекторами.

### Материалы и методы

В работе использовали NaCl (“х. ч.”), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (“х. ч.”), сахарозу (“ч. д. а.”), глюкозу (“ч. д. а.”), по-лиэтиленгликоли с молекулярной массой 1500 (ПЭГ-1500) и 2000 (ПЭГ-2000) производства Merck, декстраны с молекулярной массой 10000 (Д-10000) и 35000 (Д-35000) производства Serva, диметилсульфоксид (ДМСО) производства Sigma. Среды замораживания готовили на растворе, содержащем 0,3% NaCl и 6,85 % сахарозы. Криоконсервант содержал 20% полимера или 20% полимера и 5% проникающего криопротектора.

Эритроциты человека получали из донорской крови четырехкратным отмыванием раствором, содержащим 0,9% NaCl. Полиэтиленовые ампулы с образцами эритроцитов в средах замораживания (объемом 1 мл) с гематокритом 40% инкубировали 40 мин при 25°C, затем погружали на 30 мин в жидкий азот и размораживали на водяной бане при 40°C в течение 3 мин. Затем содержимое ампул при перемешивании разводили теплым (37°C) физиологическим раствором NaCl (0,9%) в 10 раз в течение не менее 30 с, центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин и удаляли надосадочную жидкость. Всего процедуру повторяли дважды. После этого эритроциты трижды отмывали теплым физиологическим раствором NaCl, при этом скорость разведения осадка эритроцитов не учитывали.

Осмотический лизис эритроцитов исследовали в среде, содержащей 10 мМ трис-буфер с pH 7,4 и 0,09–0,9% NaCl. Суспензию эритроцитов (1 мл) в среде с гематокритом 0,6% инкубировали 15 мин при 23°C, далее центрифугировали при 3000 об/мин в течение 3 мин.

В специальном эксперименте эритроциты с гематокритом 40% инкубировали 30 мин при 25°C в солевой среде (0,9% NaCl), содержащей 20–40% ПЭГ-1500, с последующим отмыванием физиологическим раствором NaCl при 37°C.

Степень гемолиза вычисляли после спектрофотометрического определения количества гемоглобина в супернатанте образцов, измеряя оптическую плотность при длине волны 543 нм [18]:

$$\text{Степень гемолиза} = [A_1/A_2] \times 100\%,$$

где  $A_1$  – оптическая плотность супернатанта экспериментального образца;  $A_2$  – оптическая

(D-10000) and 35,000 (D-35000) produced by Serva, dimethyl sulfoxide (DMSO) produced by Sigma were used in the work. Freezing media were prepared on solution containing 0.3% NaCl and 6.85% sucrose. Cryopreservatives comprised 20% of a polymer or 20% of a polymer and 5% of a penetrating cryoprotectant.

Human erythrocytes were isolated from donors' blood by four-time-washing with 0.9% NaCl solution. Polyethylene ampoules with erythrocyte samples in freezing media (volume of 1 ml) with 40% hematocrit were incubated at 25°C for 40 min, submerged in liquid nitrogen for 30 min and then thawed in a water bath at 40°C for 3 min. Afterwards samples were diluted tenfold with warm (37°C) physiological solution (0.9% NaCl) with stirring for not less than 30 sec, centrifuged at 3,000 rpm for 5 min, and supernatants were removed. The whole procedure was repeated twice. Afterwards erythrocytes were washed three times with warm physiological solution; the rate of erythrocyte pellet diluting was disregarded.

Osmotic lysis of erythrocytes was studied in media containing 10 mM Tris buffer, pH 7.4, and 0.09–0.9% NaCl. Erythrocyte suspension (1 ml) in medium with hematocrit 0.6% was incubated at 23°C for 15 min and centrifuged at 3000 rpm for 3 min.

In a special experiment the erythrocytes with 40% hematocrit were incubated in salt media (0.9% NaCl) containing 20–40% PEG-1500 at 25°C for 30 min with the following washing with physiological solution at 37°C.

Hemolysis level was calculated after spectrophotometric determination of haemoglobin amount in sample supernatants by measuring absorbancy at the wavelength 543 nm [18]:

$$\text{Hemolysis level} = [A_1/A_2] \times 100\%,$$

where  $A_1$  is absorbancy of an experimental sample supernatant;  $A_2$  is absorbancy after complete hemolysis of the control sample.

Mean values and variances of random variates were computed from the results on erythrocytes obtained from 5 donors. The data are presented as mean value  $\pm$  standard error. To estimate statistical significance of the results the non-parametric Mann-Whitney test with  $p < 0.05$  was used [1].

### Results and discussion

Hemolysis level changes after cryopreservation depending on polymer concentrations in freezing media are presented in Fig. 1. Usage of dextrans and PEGs yielded different results. Increasing dextran concentration up to 20% in media was accompanied by a reduction in hemolysis level. When PEGs being used hemolysis level changes are of different pattern. The

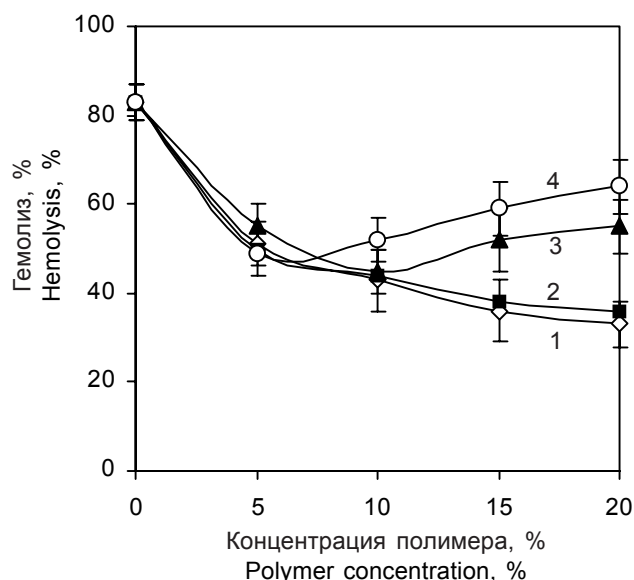
плотность при полном гемолизе контрольного образца.

Среднее значение и дисперсию случайной величины рассчитывали по результатам, полученным на эритроцитах от 5 доноров. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка. Для определения статистической достоверности результатов использовали непараметрический метод Манна-Уитни при  $p < 0,05$  [1].

### Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлено изменение степени гемолиза эритроцитов после замораживания в зависимости от концентрации полимеров в среде замораживания. При использовании декстранов и ПЭГ получены разные результаты. Увеличение концентрации декстранов в среде до 20% сопровождается снижением степени гемолиза. При использовании ПЭГ зависимости имеют другой характер. Минимальный гемолиз для ПЭГ-1500 отмечается при концентрации 5%, тогда как для ПЭГ-2000 – при 10%. Увеличение концентрации этих полимеров приводит к повышению гемолиза, однако в большей степени при использовании ПЭГ-1500. Такие результаты указывают на то, что применение данных полимеров имеет количественное ограничение, что свидетельствует о слабых криопротекторных свойствах ПЭГ по сравнению с декстранами. При 20%-й концентрации ПЭГ-1500 выявляет слабое криопротекторное действие (рис. 1).

Результаты исследования осмотического гемолиза замороженных эритроцитов представлены на рис. 2. Практически во всех случаях выявлено подобное поведение кривых осмотического лизиса в зависимости от концентрации полимеров в среде замораживания. В солевой среде с концентрацией NaCl 0,45–0,9% наблюдается рост осмотической хрупкости эритроцитов, тогда как при 0,09–0,4% – повышение их осмотической устойчивости. Кроме того, в последнем случае отмечается зависимость поведения кривых от концентрации полимеров в среде замораживания: чем больше концентрация, тем выше осмотическая устойчивость в этом интервале концентраций NaCl. Это указывает на то, что данный эффект связан с ростом концентрационного градиента полимеров на мембране клеток при замораживании. Такое предположение подтверждается экспериментом с исключением этапа замораживания, в котором эритроциты инкубировали в средах с высокой концентрацией ПЭГ-1500 и последующим отмыванием изотоническим раствором NaCl. Результаты, представленные на рис. 3, показывают, что кривые осмотического гемолиза таких эритроцитов подобны тем, которые получены для замороженных клеток (см. рис. 2), т. е. имеет место рост осмотической устойчивости при кон-

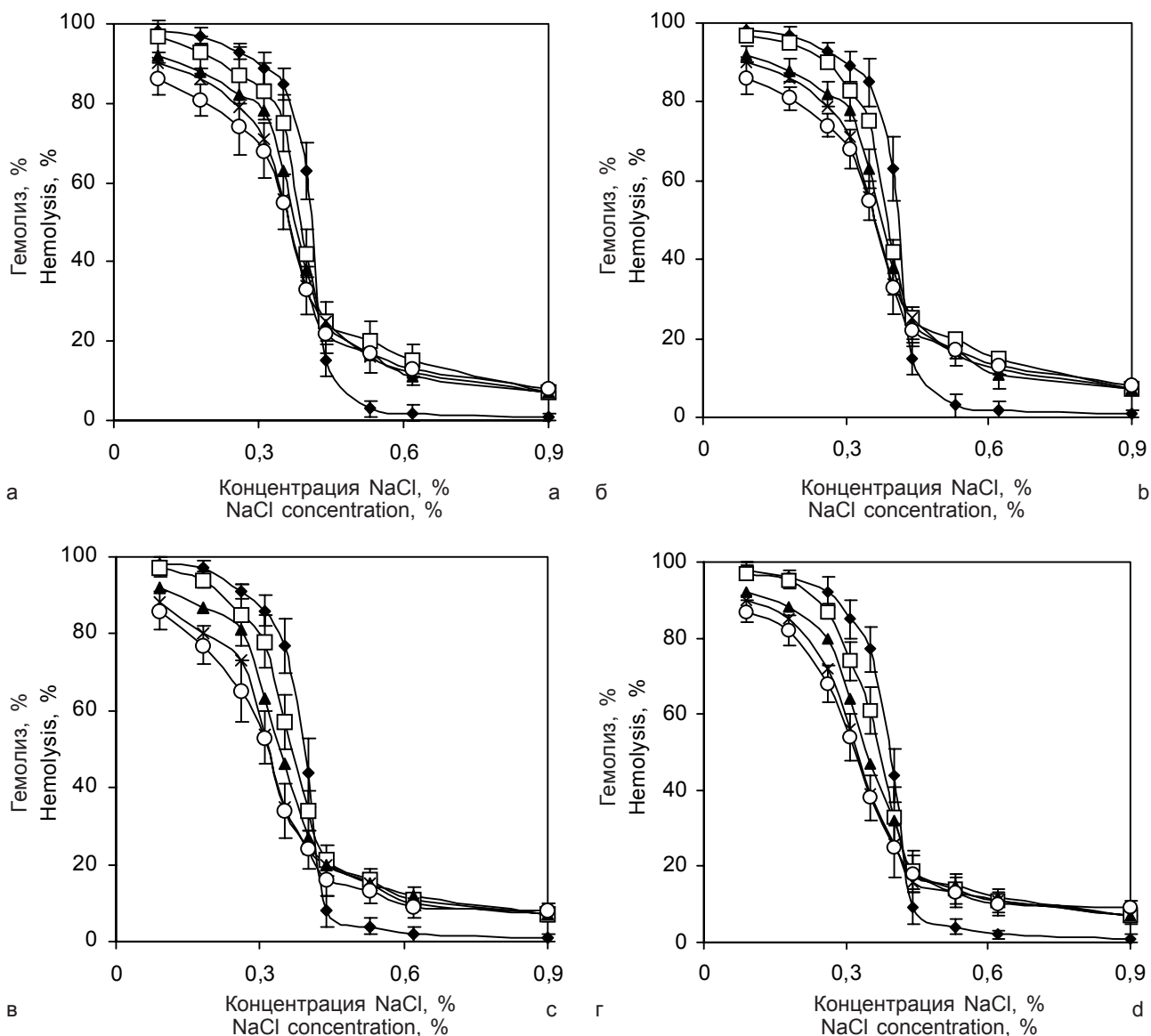


**Рис. 1.** Степень повреждения эритроцитов после замораживания-отогрева-отмывания в зависимости от концентрации полимеров в среде замораживания: 1 – Д-35000; 2 – Д-10000; 3 – ПЭГ-2000; 4 – ПЭГ-1500.

**Fig. 1.** Erythrocyte injury level after freezing-thawing-washing out depending on the polymers concentrations in the freezing media: 1 – D-35000; 2 – D-10000; 3 – PEG-2000; PEG-1500.

minimal hemolysis for PEG-1500 was registered at the concentration 5%, while the most efficient concentration for PEG-2000 is 10%. Increasing concentrations of these polymers led to a rise in hemolysis level, however this showed to a greater extent in the case of PEG-1500. Such results indicate that the application of these polymers is limited quantitatively, which attests to PEGs poor cryoprotective properties in comparison with dextrans. At the concentration of 20% PEG-1500 showed a slight cryoprotective effect (Fig. 1).

The results on osmotic hemolysis of frozen erythrocytes are presented in Fig. 2. Virtually in all the cases similar profiles of osmotic lysis curves depending on the polymers concentrations in freezing media were disclosed. A rise in erythrocyte osmotic fragility was observed in the salt media with 0.45–0.9% NaCl, while the media with 0.09–0.4% NaCl an enhancement in erythrocyte osmotic resistance was registered. Besides in the latter case osmotic hemolysis depended on the polymers concentrations in the freezing media: the higher their concentrations are, the higher osmotic resistance within this range of NaCl concentrations is. This denotes that the given effect is associated with a growth of the polymers concentration gradient on cell membranes during freezing. Such assumption is confirmed by the experiment excluding the freezing stage, in which erythrocytes were incubated in the media with high concentrations of PEG-1500 with subsequent washing with isotonic NaCl solution. The results presented in Fig. 3 show that osmotic hemolysis curves



**Рис. 2.** Осмотический гемолиз эритроцитов, отмывых после замораживания в среде с полимерами: а – Д-35000; б – Д-10000; в – ПЭГ-2000; г – ПЭГ-1500; ◆ – intactные клетки; □, ▲, ×, ○ – клетки, замороженные в средах с различными концентрациями полимеров: □ – 5%; ▲ – 10%; × – 15%; ○ – 20%.

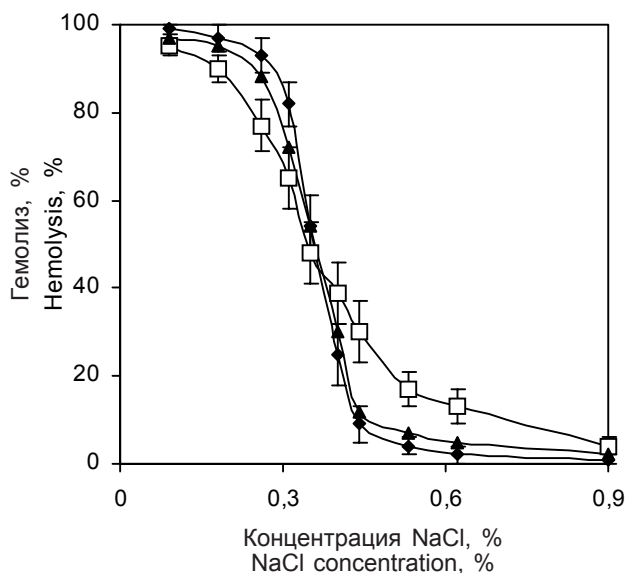
**Fig. 2.** Osmotic hemolysis of erythrocytes washed out after freezing in the media containing the polymers: а – D-35000; б – D-10000; в – PEG-2000; г – PEG-1500; ◆ – intact cells; □, ▲, ×, ○ – cells frozen in the media with different concentrations of the polymers: □ – 5%; ▲ – 10%; × – 15%; ○ – 20%.

центрации соли 0,09–0,4%. Такое поведение кривых осмотического лизиса замороженных эритроцитов указывает на структурные нарушения мембран, связанные с нарастанием концентрации полимеров при замораживании: чем больше концентрация полимера, тем выше осмотическая устойчивость размороженных эритроцитов при концентрации NaCl 0,09–0,4% (см. рис. 2).

Подобное поведение кривых осмотического гемолиза было выявлено для эритроцитов, замороженных в среде с трегалозой или декстраном [25], но не с глицерином [25, 33]. Это подтверждает то, что полученный эффект выявляется только после замораживания эритроцитов в средах с непроницающими криопротекторами.

for these erythrocytes are similar to those for frozen cells (see Fig. 2), *i. e.* there is an enhancement in osmotic resistance at the salt concentrations 0.09–0.4%. Such behavior of osmotic lysis curves for frozen erythrocytes indicates structural injuries in membranes connected with the polymers increasing concentrations during freezing. The higher the polymer concentration is, the higher osmotic resistance of thawed erythrocytes at 0.09–0.4% concentrations of NaCl is (see Fig. 2).

A similar behavior of osmotic hemolysis curves was revealed for erythrocytes frozen in media with trehalose or with dextran [25], but not with glycerol [25, 33]. This confirms the fact that the effect revealed manifests itself only after freezing erythrocytes in media with non-penetrating cryoprotectants.



**Рис. 3.** Осмотический гемолиз эритроцитов, отмытых после инкубации в среде, содержащей ПЭГ-1500: ◆ – intactные клетки; ▲ – 20%; □ – 40%.

**Fig. 3.** Osmotic hemolysis of erythrocytes washed out after incubation in the medium containing PEG-1500: ◆ – intact cells; ▲ – 20%; □ – 40%.

Замораживание эритроцитов с декстранами обеспечивает значительно меньшую степень повреждения по сравнению с ПЭГ (таблица). Включение в среды замораживания проникающих криопротекторов (особенно ДМСО или глюкозы в комбинации с декстранами) снижает степень гемолиза эритроцитов (таблица). Однако анализ полученных результатов показывает, что степень снижения повреждения после включения в криоконсервант проникающих криопротекторов в присутствии ПЭГ выше, чем декстранов. Такие результаты указывают на то, что сочетание проникающих криопротекторов с непроникающими может, во-первых, давать аддитивный эффект криопротекции, во-вторых, возможно, что проникающие криопротекторы нейтрализуют “токсический” эффект ПЭГ, который проявляется в снижении сохранности эритроцитов при повышении концентрации данных полимеров (см. рис. 1).

Осмотическая устойчивость эритроцитов, отмытых после замораживания в средах с непроникающими и проникающими криопротекторами, незначительно отличается от intactных клеток (рис. 4).

Из анализа результатов исследования осмотического гемолиза следует, что включение в среды с полимерами проникающих криопротекторов предупреждает изменение осмотических свойств замороженных эритроцитов. Предположительно, рост осмотической устойчивости в верхней части кривой осмотического лизиса (0,09–0,4% NaCl)

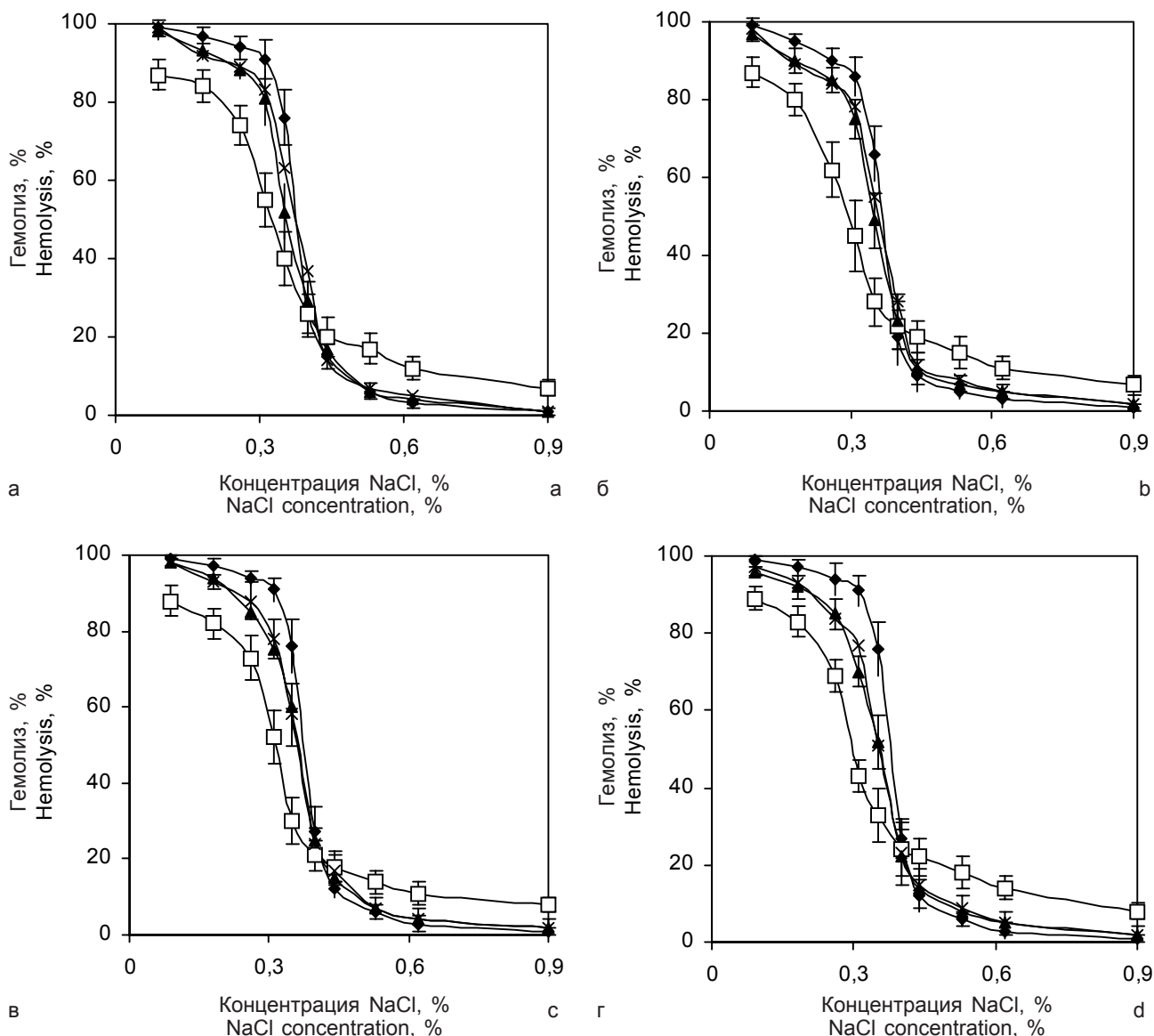
Freezing erythrocytes with dextrans provides a conspicuously lesser injury level in comparison with PEGs (Table). Inclusion of penetrating cryoprotectors (especially DMSO or glucose in combination with dextrans) to freezing media reduces hemolysis level (Table). However the analysis of the data obtained indicates that the extent of reduction in injuries after inclusion of penetrating cryoprotectants to cryopreservatives is higher with PEGs than with dextrans. Such results denote that combination of penetrating cryoprotectants with non-penetrating ones firstly can yield an additive cryoprotective effect; secondly penetrating cryoprotectants may neutralize “toxic” effects of PEGs, which is manifested as a decline in erythrocyte safety as these polymers concentrations grow (see Fig. 1).

Osmotic resistance of erythrocytes washed after freezing in media with non-penetrating and penetrating cryoprotectants differs insignificantly from that of intact cells (Fig. 4)

The analysis of the results on osmotic lysis proves that inclusion of penetrating cryoprotectants to media with polymers prevents changing osmotic characteristics of frozen erythrocytes. Hypothetically the enhancement in osmotic resistance in the upper part of the osmotic lysis curve (0.09%–0.4%) is associated with a growing gradient of the polymers concentrations on cell membranes in the process of freezing, that is why the intensity of osmotic stress declines as penetrating cryoprotectants enter the cells, and normal osmotic characteristics of membranes are maintained.

Efficiency of combined cryoprotectants can be due to a reduction in a principal cryoprotectant “toxicity” in the presence of additional ones. Freezing cells with DMSO usually leads to its negative impact at high concentrations, however freezing medium efficiency in the presence of amides increases significantly [8]. Glucose is also an efficient neutralizer of DMSO “toxicity” [6]. PEG-6000 was not shown to have any cryoprotective activity, however its combination with DMSO-glucose mixture had a good cryoprotective effect [32]. Presumably protective efficiency of non-polar cryoprotectants is associated with their exclusion from the protein hydration shell at low temperature [4]. Sucrose and glycerol cryoprotective efficiencies are determined by their interactions with membrane lipid bilayer [3]. Glycerol and DMSO at the concentration of 5% proved to be efficient when erythrocytes were chilled down to  $-30^{\circ}\text{C}$ , however their cryoprotective activity decreased drastically under chilling down to  $-130^{\circ}\text{C}$ . Glucose and sucrose are efficient when erythrocytes are frozen to  $-40$  and  $-130^{\circ}\text{C}$ . At the same time polyvinyl pyrrolidone mediates between penetrating cryoprotectants and sugars [26].

Possibly the combination of penetrating and non-penetrating cryoprotectants influences cryoprotection



**Рис. 4.** Влияние на осмотический гемолиз замороженных эритроцитов ДМСО или глюкозы в среде замораживания: а – Д-35000; б – Д-10000; в – ПЭГ-2000; г – ПЭГ-1500; ◆ – интактные клетки; ▲ – клетки, замороженные с ДМСО; × – с глюкозой; □ – без проникающих криопротекторов.

**Fig. 4.** DMSO or glucose influence on frozen erythrocyte osmotic hemolysis: а – D-35000; б – D-10000; в – PEG-2000; г – PEG-1500; ◆ – intact cells; ▲ – cells frozen with DMSO; × – cells frozen with glucose; □ – cells frozen without penetrating cryoprotectants.

связан с нарастанием градиента концентрации полимеров на мембранах клеток при замораживании, поэтому с поступлением в клетки проникающих криопротекторов снижается интенсивность осмотического стресса и поддерживаются нормальные осмотические свойства мембран.

Эффективность комбинированных криоконсервантов может быть обусловлена уменьшением “токсичности” основного криопротектора в присутствии дополнительных. Обычно замораживание клеток с ДМСО ведет к отрицательному воздействию его высоких концентраций, однако в присутствии амидов эффективность среды замораживания существенно повышается [8]. Глюкоза также

efficiency at the account of additivity or neutralization of a principal cryoprotectant “toxicity”. Indeed, application of such cryoprotectants is quite promising [5, 11, 13–15, 27–29, 32–34]. Thus, usage of combined cryopreservatives is logically relevant, however mechanisms of cryoprotective efficiency remain unexamined.

Combinations of glucose or a penetrating cryoprotectant with sucrose in cryopreservatives were suggested to eliminate “packing” effect at the account of osmotic stabilization of membranes in the process of rapid freezing-thawing [2]. In literature there are data that “packing” effect elimination is accompanied by maintenance of erythrocyte osmotic fragility both as glycerol concentration in freezing medium increases

является эффективным нейтрализатором “токсичности” ДМСО [6]. Показано, что ПЭГ-6000 не выявляет криопротекторного воздействия, однако его комбинирование со смесью ДМСО и глюкозы имеет хороший криопротекторный эффект [32]. Предполагается, что защитная эффективность неполярных криопротекторов связана с их исключением из гидратной оболочки белков при низкой температуре [4]. Криопротекторная эффективность сахарозы и глицерина определяется их взаимодействием с липидным бислоем мембраны [3]. Глицерин и ДМСО в концентрации 5% оказались эффективными при замораживании эритроцитов до  $-30^{\circ}\text{C}$ , однако при замораживании до  $-130^{\circ}\text{C}$  их криопротекторная активность резко снижается. Глюкоза и сахароза эффективны при замораживании эритроцитов до температуры  $-40$  и  $-130^{\circ}\text{C}$ . При этом поливинилпирролидон по защитной активности занимает промежуточное положение между проникающими криопротекторами и сахарами [26].

Вероятно, сочетание проникающих и непроникающих криопротекторов влияет на эффективность криопротекции за счет аддитивности или нейтрализации “токсичности” основного криопротектора. Действительно, применение подобных криоконсервантов перспективно [5, 11, 13–15, 27–29, 32–34]. Таким образом, использование комбинированных криоконсервантов логически обосновано, однако механизмы криопротекторной эффективности остаются не исследованными.

Предполагалось, что сочетание в криоконсерванте глюкозы или проникающего криопротектора с сахарозой устраняет эффект “упаковки” за счет осмотической стабилизации мембран при быстром замораживании-отогреве [2]. В литературе имеются данные, что устранение эффекта “упаковки” сопровождается сохранением осмотической хрупкости эритроцитов как при повышении концентрации глицерина в среде замораживания (от 20 до 40%), так и при включении в криоконсервант мембранотропных реагентов [33]. Кроме того, показана криопротекторная эффективность комбинированного состава, содержащего стабилизаторы мембран и невысокие концентрации проникающих и непроникающих криопротекторов, замораживание в котором существенно не изменяет осмотическую хрупкость эритроцитов [34]. Полученные результаты относительно осмотического гемолиза эритроцитов, замороженных в комбинированных средах (рис. 4), согласуются с этими данными литературы и подтверждают положение о том, что устранение эффекта “упаковки” сопровождается осмотической стабилизацией мембран клеток в ходе замораживания-отогрева.

Анализ степени гемолиза эритроцитов после замораживания показывает, что лучшие результаты

from 20 to 40% and as membrane-tropic agents are included to cryopreservatives [33]. Besides cryoprotective efficiency of a combined composition containing membrane stabilizers and low concentrations of penetrating and non-penetrating cryoprotectants was shown. Freezing in this composition did not change significantly erythrocyte osmotic fragility [34]. The results obtained on osmotic lysis of erythrocytes frozen in combined media (Fig. 4) are consistent with these literature data and confirm the assumption that “packing” effect elimination is accompanied by cell membrane osmotic stabilisation in the course of freeze-thawing.

The analysis of erythrocyte hemolysis level after freezing shows that the best results were obtained when cryopreservatives containing D-35000 and DMSO or D-35000 and glucose were used (Table). A peculiarity of the data obtained lies in the fact that adding a penetrating cryoprotectant at relatively low concentrations to the cryopreservative reduces considerably the severity of erythrocyte injuries (Table).

In this respect it should be noted that the penetrating cryoprotectants (glycerol and DMSO) are unable to protect cells during rapid freezing [16], however using their combinations with non-penetrating cryoprotectants one can get a novel feature of a combined composition, which counteracts damaging factors under rapid freeze-thawing. It was shown that freezing the granulocytes with hydroxyethyl starch with low rates is inefficient, but its combination with DMSO has a significant cryoprotective activity [12]. A similar result was obtained with freezing bone marrow cells [31]. In most cases usage of combined cryopreservatives simplifies freezing procedure [13–15, 30, 31]. It may be associated with the fact that usage of combined cryopreservatives allows avoiding considerable supercooling of cell samples at the moment of initial crystallisation [14, 31].

Presumably cryoprotective activity of polymer non-penetrating cryoprotectants is associated with their ability to maintain reparative properties of cell membranes in the course of freezing. After thawing cells maintain capacity for restoring their cationic balance [19]. Polymer protective activity is also associated with water structuring and maintaining it in liquid state at rather low temperatures in the process of freezing ( $-35^{\circ}\text{C}$ ) [7]. Nevertheless along with positive effects the polymers’ concentrating in the course of freezing contribute considerably to a growth of osmotic gradient on cell membranes [7, 20], as a result the osmotic properties of frozen cells will be different from those of normal ones. As for penetrating cryoprotectants their cryoprotective activity is associated with a retardation of the solution concentration and a decline in cell hydration [19]. In medium containing sucrose and a polymer the cells undergo osmotic stress because of considerable dehydration during freezing [20]. If a penetrating



получены при использовании криоконсервантов, содержащих Д-35000 и ДМСО или Д-35000 и глюкозу (таблица). Особенностью полученных данных является то, что добавление в криоконсервант проникающего криопротектора в относительно небольшом количестве (5%) существенно уменьшает степень повреждения эритроцитов (таблица).

В связи с этим необходимо отметить, что проникающие криопротекторы (глицерин и ДМСО) не способны протектировать клетки при быстром замораживании [16], однако при их сочетании с непроницаемыми криопротекторами можно получить новое качество комбинированного состава, которое противодействует повреждающим факторам при быстром замораживании-отогреве. Показано, что замораживание гранулоцитов с гидроксипропиловым крахмалом при низкой скорости не эффективно, однако его сочетание с ДМСО имеет значительный криопротекторный эффект [12]. Подобный результат получен при замораживании клеток костного мозга [31]. В большинстве случаев использование комбинированных криоконсервантов упрощает процедуру замораживания [13–15, 30, 31]. Вероятно, это связано с тем, что использование комбинированных криоконсервантов позволяет избежать значительного переохлаждения клеточного образца в момент начальной кристаллизации [14, 31].

Предполагается, что криозащитное действие непроницаемых полимерных криопротекторов связано с их способностью сохранять репаративные свойства клеточных мембран в процессе замораживания. После размораживания клетки сохраняют способность восстанавливать свой катионный баланс [19]. Кроме того, защитное действие полимеров связано со структурированием воды и поддержанием ее в жидком состоянии при достаточно низких температурах в ходе замораживания ( $-35^{\circ}\text{C}$ ) [7]. Однако полимеры, концентрируясь в ходе замораживания наряду с положительными эффектами, вносят значительный вклад в нарастание осмотического градиента на мембранах клеток [7, 20], вследствие чего осмотические свойства замороженных клеток будут отличаться от нормальных. Для проникающих криопротекторов криозащитный эффект связан с замедлением концентрирования раствора и уменьшением степени дегидратации клеток [19]. В среде, содержащей сахарозу и полимер, клетки при замораживании испытывают осмотический стресс из-за значительной дегидратации [20]. Если в такую среду дополнительно включить проникающий криопротектор, то уменьшится степень дегидратации клеток и соответственно осмотический стресс при замораживании. Уменьшение степени дегидратации кле-

Степень повреждения эритроцитов, замороженных в средах с непроницаемыми и проникающими криопротекторами

Erythrocyte injury level after freezing in media with non-penetrating and penetrating cryoprotectants

Среды замораживания Freezing media	Гемолиз после замораживания-отогрева-отмывания, % Hemolysis after freezing-thawing-washing out, %
Δ-35000 (20%) D-35000 (20%)	36,7 ± 4,0
Δ-35000 (20%) + ДМСО (5%) D-35000 (20%) + DMSO (5%)	15,8 ± 4,1
Δ-35000 (20%) + глюкоза (5%) D-35000 (20%) + glucose (5%)	17 ± 4,2
Δ-10000 (20%) D-10000 (20%)	40,4 ± 5,6
Δ-10000 (20%) + ДМСО (5%) D-10000 (20%) + DMSO (5%)	17,4 ± 4,2
Δ-10000 (20%) + глюкоза (5%) D-10000 (20%) + glucose (5%)	17,7 ± 5,4
ПЭГ-2000 (20%) PEG-2000 (20%)	55,0 ± 4,7
ПЭГ-2000 (20%) + ДМСО (5%) PEG-2000 (20%) + DMSO (5%)	29,2 ± 4,3
ПЭГ-2000 (20%) + глюкоза (5%) PEG-2000 (20%) + glucose (5%)	27,0 ± 4,8
ПЭГ-1500 (20%) PEG-1,500 (20%)	64,0 ± 3,0
ПЭГ-1500 (20%) + ДМСО (5%) PEG-1500 (20%) + DMSO (5%)	33,8 ± 4,2
ПЭГ-1500 (20%) + глюкоза (5%) PEG-1500 (20%) + glucose (5%)	37,6 ± 5,6

cryoprotectant is added to such medium, cell dehydration will decrease and, consequently, osmotic stress will weaken in the course of freezing. A decrease in cell dehydration provides conditions for weakening impact of osmotic mechanisms of injuries in the process of thawing. These mechanisms are associated with water influx and outflux from the cells during slow thawing [9] or with dilution of external medium on the final stage of rapid thawing owing to the melting of extracellular ice, a considerable portion of which was formed from intracellular water [10].

Thus, inclusion of penetrating cryoprotectants to cryopreservatives can be an efficient approach to reducing osmotic stress occurring in the course of freezing with non-penetrating cryoprotectants. Prevention of considerable dehydration of cells during freezing will result in weakening osmotic mechanisms of cell injuries in the process of thawing cell suspensions. Combination of non-penetrating and penetrating cryoprotectants in cryopreservatives will create a novel cryoprotective feature of the combined composition, which will counteract damaging factors in the process of freeze-thawing and provide high safety and satis-

ток создает условия для ослабления влияния осмотических механизмов повреждения при размораживании. Эти механизмы связаны с входом и выходом воды из клеток при медленном размораживании [9] или разведением внешней среды на конечном этапе быстрого размораживания вследствие плавления внеклеточного льда, значительная часть которого образована из внутриклеточной воды [10].

Таким образом, включение в криоконсервант проникающего криопротектора может быть эффективным для уменьшения осмотического стресса, создаваемого в ходе замораживания с непроницаемыми криопротекторами. Предупреждение значительной дегидратации клеток в ходе замораживания приведет к ослаблению осмотических механизмов повреждения клеток при отогреве клеточных суспензий. Сочетание в криоконсерванте непроницающих и проникающих криопротекторов создает новое криозащитное свойство комбинированного состава, которое противодействует повреждающим факторам при замораживании-отогреве, обеспечивает высокую сохранность и удовлетворительные осмотические свойства клеток после отмывания от криоконсерванта.

### Выводы

В эритроцитах, замороженных в сахарозо-солевой среде с непроницаемыми полимерными криопротекторами (ПЭГ-1500, ПЭГ-2000, Д-10000, Д-35000), отмечены значительные изменения осмотических свойств по сравнению с интактными клетками: снижение осмотической устойчивости в интервале концентраций NaCl 0,45–0,9%; повышение осмотической устойчивости в интервале 0,09–0,4%. При включении в криоконсервант проникающего криопротектора (ДМСО, глюкоза) существенных отклонений осмотических свойств замороженных клеток не наблюдается.

### Литература

1. Ашмарин И.П., Васильев И.П., Амбросов В.А. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов.– Л., 1975.–76 с.
2. Рамазанов В.В. Влияние комбинированных сред на повреждение эритроцитов, замороженных с различным гематокритом // Пробл. криобиологии.– 2006.– Т. 16, №2.– С. 155–163.
3. Anchoroguy T.J., Rudolph A.S., Carpenter J.F., Crowe J.H. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing// Cryobiology.– 1987.–Vol. 24, N4.– P. 324–331.
4. Arakawa T., Carpenter J.F., Kita Y.A., Crowe J.H. The basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis // Cryobiology.– 1990.– Vol. 27, N4.– P. 401–415.
5. Clapissou G., Salinas C., Malacher P. et al. Cryopreservation with hydroxyethylstarch (HES) + dimethylsulphoxide (DMSO)

factory osmotic properties of cells after washing them from the cryopreservant.

### Conclusions

Considerable changes of osmotic characteristics were registered in erythrocytes frozen in sucrose-salt media with the non-penetrating polymer cryoprotectants (PEG-1500, PEG-200, D-10000, D-35000) in comparison with intact cells: a decline in osmotic resistance within the range of NaCl concentrations 0.45–0.9%; a rise in osmotic resistance within the range of NaCl concentrations 0.09–0.4%. When a penetrating cryoprotectant (DMSO, glucose) is added to cryopreservatives, there are no significant divergences in osmotic characteristics of frozen cells.

### References

1. Ashmarin I.P., Vasilyev I.P., Ambrosov B.A. Quick methods for statistical processing and experiment designing. – Leningrad, 1985.– 76 p.
2. Ramazanov V.V. Effect of combined media on damage of erythrocytes, frozen with different hematocrit values // Problems of Cryobiology.– 2006.– Vol. 16, N2.– P. 155–163.
3. Anchoroguy T.J., Rudolph A.S., Carpenter J.F., Crowe J.H. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing // Cryobiology.– 1987.–Vol. 24, N4.– P. 324–331.
4. Arakawa T., Carpenter J.F., Kita Y.A., Crowe J.H. The basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis // Cryobiology.– 1990.– Vol. 27, N4.– P. 401–415.
5. Clapissou G., Salinas C., Malacher P. et al. Cryopreservation with hydroxyethylstarch (HES) + dimethylsulphoxide (DMSO) gives better results than DMSO alone // Bull. Cancer.– 2004.– Vol. 91, N4.– P. E97–102.
6. Clark P., Hawkins H.E., Karow A.M. The influence of vehicle solutions on the toxicity of dimethyl sulfoxide to renal cortex // Cryobiology.– 1983.– Vol. 20, N6.– P. 701.
7. Connor W., Ashwood-Smith M.J. Cryoprotection of mammalian cells in tissue culture with polymers; possible mechanisms // Cryobiology.– 1973.– Vol. 10, N6.– P. 488–496.
8. Fahy G.M. Cryoprotectant toxicity neutralizers reduce freezing damage // Cryoletters.– 1983.– Vol. 4.– P. 309–314.
9. Farrant J., Walter C.A., Lee H., McGann L.E. Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing // Cryobiology.– 1977.– Vol. 14, N3.– P. 273–286.
10. Levin R.L. The limiting effects of heat and mass transfer on the osmotic behavior of cells during freezing and thawing // Cryobiology.– 1982.– Vol. 19, N6.– P. 669.
11. Lionetti F.J., Hunt S.M., Gore J.M., Curby W.A. Cryopreservation of human granulocytes // Cryobiology.– 1975.– Vol. 2, N3.– P. 181–191.
12. Lionetti F.J., Luscinskas F.W., Hant S.M. et al. Factors affecting the stability of cryogenically preserved granulocytes // Cryobiology.– 1980.– Vol. 17, N3.– P. 297–310.
13. Liu K.Y., Dong W.C., Wang Y.L. et al. Study on non-programmed process using dimethyl sulfoxide and hydroxyethyl starch as cryoprotectants in cryopreservation of cord blood hematopoietic cells // Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.– 2004.– Vol. 12, N5.– P. 670–673.
14. Luo K., Wu G., Wang Q. et al. Effect of dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch in the preservation of fractionated human marrow cells// Cryobiology. – 1994. – Vol. 31, N 4.– P. 349–354.

- gives better results than DMSO alone // *Bull. Cancer.*– 2004.– Vol. 91, N4.– P. E97–102.
6. *Clark P., Hawkins H.E., Karow A.M.* The influence of vehicle solutions on the toxicity of dimethyl sulfoxide to renal cortex // *Cryobiology.*– 1983.– Vol. 20, N6.– P. 701.
  7. *Connor W., Ashwood-Smith M.J.* Cryoprotection of mammalian cells in tissue culture with polymers; possible mechanisms // *Cryobiology.*– 1973.– Vol. 10, N6.– P. 488–496.
  8. *Fahy G.M.* Cryoprotectant toxicity neutralizers reduce freezing damage // *Cryoletters.*– 1983.– Vol. 4.– P. 309–314.
  9. *Farrant J., Walter C.A., Lee H., McGann L.E.* Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing // *Cryobiology.*– 1977.– Vol. 14, N3.– P. 273–286.
  10. *Levin R.L.* The limiting effects of heat and mass transfer on the osmotic behavior of cells during freezing and thawing // *Cryobiology.*– 1982.– Vol. 19, N6.– P. 669.
  11. *Lionetti F.J., Hunt S.M., Gore J.M., Curby W.A.* Cryopreservation of human granulocytes // *Cryobiology.*– 1975.– Vol. 2, N3.– P. 181–191.
  12. *Lionetti F.J., Luscinskas F.W., Hant S.M. et al.* Factors affecting the stability of cryogenically preserved granulocytes // *Cryobiology.*– 1980.– Vol. 17, N3.– P. 297–310.
  13. *Liu K.Y., Dong W.C., Wang Y.L. et al.* Study on non-programmed process using dimethyl sulfoxide and hydroxyethyl starch as cryoprotectants in cryopreservation of cord blood hematopoietic cells // *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.*– 2004.– Vol. 12, N5.– P. 670–673.
  14. *Luo K., Wu G., Wang Q. et al.* Effect of dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch in the preservation of fractionated human marrow cells // *Cryobiology.* – 1994. – Vol. 31, N 4.– P. 349–354.
  15. *Maruyama M., Kenmochi T., Sakamoto K. et al.* Simplified method for cryopreservation of islets using hydroxyethyl starch and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants // *Transplant. Proc.*– 2004.– Vol. 36, N4.– P. 1133–1134.
  16. *Mazur P.* The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates // *Cryobiology.*– 1977.– Vol. 14, N3.– P. 251–272.
  17. *Mazur P., Cole K.W.* Influence of cell concentration on the contribution of unfrozen fraction and salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes // *Cryobiology.*– 1985.– Vol. 22, N6.– P. 509–536.
  18. *Mazur P., Miller R.H.* Survival of frozen-thawed human red cells as a function of the permeation of glycerol and sucrose // *Cryobiology.*– 1976.– Vol. 13, N5.– P. 523–536.
  19. *Meryman H.T.* Cryoprotective agents // *Cryobiology.*– 1971.– Vol. 8, N2.– P. 173–183.
  20. *Meryman H.T., Williams R.J., Douglas M.S.* Freezing injury from “solution effects” and its prevention by natural or artificial cryoprotection // *Cryobiology.*– 1977.– Vol. 14, N3.– P. 287–302.
  21. *Nei T.* Effect of initial of cell concentration of the post-thaw hemolysis of frozen erythrocytes // *Cryobiology.*– 1976.– Vol. 13, N6.– P. 651.
  22. *Nei T.* Mechanism of freezing injury to erythrocytes: effect of initial cell concentration on the post-thaw hemolysis // *Cryobiology.*– 1981.– Vol. 18, N3.– P. 229–237.
  23. *Pegg D.E.* The effect of cell concentration on the recovery of human erythrocytes after freezing and thawing in the presence of glycerol // *Cryobiology.*– 1981.– Vol. 18, N3.– P. 221–228.
  24. *Pegg D.E., Diaper M.P., Skaer H.L., Hunt C.J.* The effect of cooling rate and warming rate on the packing effect in human erythrocytes frozen and thawed in the presence of 2 M glycerol // *Cryobiology.*– 1984.– Vol. 21, N5.– P. 491–502.
  25. *Pellerin-Mendes C., Million L., Marchand-Arvier M. et al.* *In vitro* study of the protective effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen // *Cryobiology.*– 1997.– Vol. 35, N2.– P. 173–186.
  26. *Rapatz G., Luyet B.* Combined effects of freezing rates and of various protective agents on the preservation of human erythrocytes // *Cryobiology.*– 1968.– Vol. 4, N5.– P. 215–222.
  27. *Reiners B., Zintl F., Plenert W.* Use of human albumin as an additional cryoprotective agent in freeze preservation of hematopoietic stem cells // *Folia Haematol. Int. Mag. Klin. Morphol. Blutforsch.*– 1987.– Vol. 114, N2.– P. 264–272.
  28. *Rowley S.D., Feng Z., Chen L., et al.* A randomized phase III clinical trial of autologous blood stem cell transplantation comparing cryopreservation using dimethylsulfoxide vs dimethylsulfoxide with hydroxyethylstarch // *Bone Marrow Transplant.*– 2003.– Vol. 31, N11.– P. 1043–1051.
  29. *Simon J.D., Albala B.B., Flinton L.J. et al.* The cryopreservation of human lymphocytes // *Cryobiology.*– 1974.– Vol. 11, N6.– P. 543.
  30. *Stiff P.J., Koester A.R., Weidner M.K. et al.* Autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch without controlled-rate freezing // *Blood.*– 1987.– Vol. 70, N4.– P. 974–978.
  31. *Stiff P.J., Murgu A.J., Zaroulis C.G. et al.* Unfractionated human marrow cell cryopreservation using dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch // *Cryobiology.*– 1983.– Vol. 20, N1.– P. 17–24.
  32. *Ulrich J.M., Finkle B.J., Moore P.H., Ginoza H.* Effect of a mixture of cryoprotectants in attaining liquid nitrogen survival of callus cultures of a tropical plant // *Cryobiology.*– 1979.– Vol. 16, N6.– P. 550–556.
  33. *Wagner C.T., Burnett M.B., Livesey S.A., Connor J.* Red blood cell stabilization reduces the effect of cell density on recovery following cryopreservation // *Cryobiology.*– 2000.– Vol. 41, N3.– P. 178–194.

26. *Rapatz G., Luyet B.* Combined effects of freezing rates and of various protective agents on the preservation of human erythrocytes // *Cryobiology.*– 1968.– Vol. 4, N5.– P. 215–222.
27. *Reiners B., Zintl F., Plenert W.* Use of human albumin as an additional cryoprotective agent in freeze preservation of hematopoietic stem cells// *Folia Haematol. Int. Mag. Klin. Morphol. Blutforsch.*– 1987.– Vol. 114, N2.– P. 264–272.
28. *Rowley S.D., Feng Z., Chen L., et al.* A randomized phase III clinical trial of autologous blood stem cell transplantation comparing cryopreservation using dimethylsulfoxide vs dimethylsulfoxide with hydroxyethylstarch// *Bone Marrow Transplant.*– 2003.– Vol. 31, N11.– P. 1043–1051.
29. *Simon J.D., Albala B.B., Flinton L.J. et al.* The cryopreservation of human lymphocytes // *Cryobiology.*– 1974.– Vol. 11, N6.– P. 543.
30. *Stiff P.J., Koester A.R., Weidner M.K. et al.* Autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch without controlled-rate freezing // *Blood.*– 1987.– Vol. 70, N4.– P. 974–978.
31. *Stiff P.J., Murgu A.J., Zaroulis C.G. et al.* Unfractionated human marrow cell cryopreservation using dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch // *Cryobiology.*– 1983.– Vol. 20, N1.– P. 17–24.
32. *Ulrich J.M., Finkle B.J., Moore P.H., Ginoza H.* Effect of a mixture of cryoprotectants in attaining liquid nitrogen survival of callus cultures of a tropical plant // *Cryobiology.*– 1979.– Vol. 16, N6.– P. 550–556.
33. *Wagner C.T., Burnett M.B., Livesey S.A., Connor J.* Red blood cell stabilization reduces the effect of cell density on recovery following cryopreservation // *Cryobiology.*– 2000.– Vol. 41, N3.– P. 178–194.
34. *Wagner C.T., Martowicz M.L., Livesey S.A., Connor J.* Biochemical stabilization enhances red blood cell recovery and stability following cryopreservation // *Cryobiology.*– 2002.– Vol. 45, N2.– P. 153–166.

*Accepted in 06.10.2009*

*Поступила 06.10.2009  
Рецензент О.И. Гордиенко*