

УДК 57.043:577.352.4:547.42/43

В.В. Рамазанов

## Криозащитная эффективность комбинированной среды с непроникающим и проникающим криопротекторами при замораживании эритроцитарных суспензий различного объема

UDC 57.043:577.352.4:547.42/43

V.V. Ramazanov

### Cryoprotective Efficiency of Medium Combining Non-Penetrating and Penetrating Cryoprotectants When Freezing Erythrocyte Suspensions of Various Volumes

**Реферат:** Исследовали осмотические свойства эритроцитов, замороженных в виде суспензий различных объемов в комбинированной среде с декстраном (15%) и ДМСО (5%). Установлено, что увеличение объема замораживаемых образцов и уменьшение скорости замораживания и отогрева не приводят к значительному росту потока ионов  $H^+$  и потере барьерной функции мембран для глутатиона в клетках, отмытых от криоконсерванта. Полученные результаты позволяют предположить, что замораживание в комбинированной среде, независимо от скорости охлаждения, обеспечивает оптимальную дегидратацию клеток. Это определяется тем, что включение в криоконсервант с декстраном ДМСО и поступление его в клетки уменьшает степень дегидратации и гипертонического стресса, которые обусловлены концентрированием непроникающих компонентов среды при замораживании. Ослабление гипертонического стресса является условием устойчивости мембран эритроцитов к постгипертоническому стрессу при размораживании и обеспечивает сохранение осмотических свойств клеток, отмытых от криоконсерванта.

**Ключевые слова:** комбинированные криоконсерванты, декстран, диметилсульфоксид, эритроциты, осмотические свойства, барьерные свойства мембран, глутатион, сульфат.

**Реферат:** Досліджували осмотичні властивості еритроцитів, заморожених у вигляді суспензій різних об'ємів у комбінованому середовищі із декстраном (15%) і ДМСО (5%). Встановлено, що збільшення об'єму заморожених зразків і зменшення швидкості заморожування та відігріву не призводять до значного зростання потоку іонів  $H^+$  і втрати бар'єрної функції мембран для глутатіону у клітинах, відмитих від криоконсерванта. Отримані результати дозволяють припустити, що заморожування у комбінованому середовищі, незалежно від швидкості охолодження, забезпечує оптимальну дегідратацію клітин. Це визначається тим, що включення у криоконсервант з декстраном ДМСО і надходження його в клітини призводить до зменшення ступеня дегідратації та гіпертонічного стресу, які обумовлені концентруванням непроникаючих компонентів середовища при заморожуванні. Ослаблення гіпертонічного стресу є умовою стійкості мембран еритроцитів до постгіпертонічного стресу при розморожуванні та забезпечує збереження осмотичних властивостей клітин, відмитих від криоконсерванта.

**Ключові слова:** комбіновані криоконсерванти, декстран, диметилсульфоксид, еритроцити, осмотичні властивості, бар'єрні властивості мембран, глутатіон, сульфат.

**Abstract:** Osmotic properties of erythrocytes, frozen in suspensions with different volumes in combined medium with 15% dextran and 5% DMSO were studied. It was established that the increasing of sample volume subjected to freezing and reduction of freezing and thawing rate did not result in a significant rise of  $H^+$  ion flow and loss of membrane barrier function in respect of glutathione in cells washed free of cryopreservative. The obtained results allowed to suggest that freezing in combined medium independent on cooling rate provided optimal dehydration of cells. It was determined that inclusion of DMSO into a cryopreservative based on dextran and its penetration into cells decreased dehydration and hypertonic stress rate, stipulated by concentrating of non-penetrating components of medium during freezing. Lowering of hypertonic stress was a pre-condition of erythrocyte membrane resistance to post-hypertonic stress during freeze-thawing and contributed to preservation of osmotic properties of cells washed free of cryopreservative.

**Key words:** combined cryopreservatives, dextran, dimethyl sulfoxide, erythrocytes, osmotic properties, membrane barrier properties, glutathione, sulfate.

Отдел криофизиологии клетки, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

**\*Адрес для корреспонденции:**

ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015;  
тел.: (+38 057) 373-41-35, факс: (+38 057) 373-30-84,  
электронная почта: ramazanov.viktor@mail.ru

Поступила 05.07.2011  
Принята в печать 10.04.2013

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т. 23, №2. – С. 124–134.  
© 2013 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

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

**\*Address for correspondence:**

23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;  
tel.: +380 57 373 4135, fax: +380 57 373 3084,  
e-mail: ramazanov.viktor@mail.ru

Received July 5, 2011  
Accepted April 10, 2013

Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2013. – Vol. 23, Nr. 2. – P. 124–134.  
© 2013 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

Комбинированные криоконсерванты с непроницающими и проникающими криопротекторами используются при замораживании различных клеток [11, 15, 16, 18, 22, 24, 28]. Показана эффективность среды, содержащей диметилсульфоксид (ДМСО) и гидроксипропилированный крахмал (ГЭК), при замораживании стволовых клеток периферической крови [11, 22, 24], нефракционированных клеток костного мозга [25, 26], гемопоэтических клеток кордовой крови [16], клеток поджелудочной железы человека [18]. Кроме того, отмечена криозащитная эффективность сред, содержащих полиэтиленгликоль (ПЭГ-1500) или поливинилпирролидон (ПВП) в комбинации с 1,2-пропандиолом (1,2-ПД), при замораживании эритроцитов [2, 3].

При изучении сохранности эритроцитов после замораживания-отогрева в комбинированных средах с различными полимерами (ПЭГ-1500, ПВП) и проникающим криопротектором 1,2-ПД установлено, что такое сочетание позволяет снизить концентрацию 1,2-ПД и получить высокую сохранность размороженных эритроцитов в ресуспендирующей среде в течение 3-х суток после отмывания [2, 3].

Исследование эффективности трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) после замораживания в среде, содержащей ДМСО (10%) или ДМСО (5%) + ГЭК (6%), показало, что на 10-е сутки в крови реципиентов, которым вводили клетки, замороженные-отогреты в комбинированном криоконсерванте, содержание белых клеток составляло  $1 \times 10^9$  клеток/л. Такое же содержание клеток отмечено на 11-е сутки у реципиентов, которым вводили ГСК, замороженные-отогреты в среде с ДМСО. Концентрация нейтрофилов в крови увеличивалась до  $(0,5-1) \times 10^9$  клеток/л быстрее у реципиентов, которым вводили ГСК, замороженные-отогреты в комбинированной среде [24].

Замораживание клеток костного мозга в комбинированной среде ДМСО (5%) + ГЭК (5%) сопровождалось уменьшением степени переохлаждения клеточных образцов по сравнению со средой, содержащей только ДМСО (10%) [17]. Кроме того, при сочетании ДМСО и ГЭК оказалось возможным неконтролируемое (без использования программного замораживателя) охлаждение при замораживании гемопоэтических клеток кордовой крови [16], стволовых клеток периферической крови [11], клеток поджелудочной железы [18], нефракционированных клеток костного мозга [25, 26].

Таким образом, применение комбинированной среды ДМСО + ГЭК эффективно при замораживании различных клеток позволяет исключить программное замораживание и в некоторых случаях улучшить функциональные показатели размороженных клеток. Не исключено, что подобной

Combined cryopreservatives with non-penetrating and penetrating cryoprotectants are used when freezing various cells [11, 15, 16, 18, 22, 24, 28]. There was shown the efficiency of medium, containing dimethyl sulfoxide (DMSO) and hydroxyethyl starch (HES) when freezing stem cells from peripheral blood [11, 22, 24], non-fractionated cells of bone marrow [25, 26], hemopoietic cells of cord blood [16] and human pancreas cells [18]. In addition when freezing erythrocytes [2, 3] there was found a cryoprotective efficiency of the media containing either polyethylene glycol (PEG-1500) or polyvinyl pyrrolidone (PVP) combined with 1,2-propanediol (1,2-PD) [2, 3].

Assessing the erythrocyte survival after freeze-thawing in combined media with different polymers (PEG-1500, PVP) and penetrating cryoprotectant 1,2-PD it was established that this combination enabled to reduce concentration of 1,2-PD and obtain a high survival of frozen-thawed erythrocytes in re-suspending medium during 3 days after washing [2, 3].

Transplantation of hemopoietic stem cells (HSCs) frozen-thawed in the medium, containing either DMSO (10%) or DMSO (5%) + HES (6%) resulted in rising the content of white blood cells up to  $1 \times 10^9$  cells/l in blood of recipients to the 10<sup>th</sup> day after transfusion of the cells, frozen-thawed in a combined cryopreservative. The same content of cells was found to the 11<sup>th</sup> day in the recipients underwent transfusion with HES frozen-thawed in the medium with DMSO. Concentration of neutrophils in blood was increased up to  $(0.5-1) \times 10^9$  cells/l earlier in the patients underwent transfusion with HES frozen-thawed in a combined medium [24].

Freezing of bone marrow cells in combined medium of 5% DMSO + 5% HES was accompanied with lower supercooling rate if compared with the medium, containing only 10% DMSO [17]. In addition, combination of DMSO and HES allowed to perform uncontrolled (without using of a programmable freezer) cooling for freezing hemopoietic cells from cord blood [16], stem cells of peripheral blood [11], pancreatic cells [18], non-fractionated cells of bone marrow [25, 26].

Thus, application of DMSO + HES combined medium was effective for freezing different cells and enabled to exclude programmed freezing and in some cases improved functional indices of frozen-thawed cells. It can not be excluded that the combined cryopreservatives based on other non-penetrating and penetrating cryoprotectants possess the same efficiency independently on used cooling regimens. The increasing of volume of frozen cell suspensions could result in reduction of cooling rate, therefore it is necessary to assess the effect of cooling regimens if different volumes of samples are used.

Sulfate transport into erythrocytes when using sulfate medium is coupled with transport of H<sup>+</sup> ions

эффективностью обладают комбинированные криоконсерванты, включающие другие непроницающие и проникающие криопротекторы, независимо от используемых режимов охлаждения. Увеличение объема замораживаемых клеточных суспензий приведет к уменьшению скорости их охлаждения, поэтому для оценки влияния режимов охлаждения необходимо использовать разные объемы образцов.

Транспорт сульфата внутрь эритроцитов при использовании сульфатной среды сопряжен с транспортом ионов  $H^+$  [23]. Можно предположить, что при повреждении мембран анионы  $SO_4^{2-}$  и соответственно ионы  $H^+$  будут проникать в эритроциты дополнительным неспецифическим путем. При этом вычисляемые скорости транспорта ионов могут превышать таковые показатели для интактных клеток. Поэтому результаты исследования транспорта ионов  $H^+$  и анионов  $SO_4^{2-}$  могут использоваться для оценки барьерной функции мембран эритроцитов после замораживания-отогрева. При замораживании в мембранах эритроцитов возможно появление повреждений, которые при отмывании криоконсерванта будут способствовать образованию гемолитических пор, проницаемых для гемоглобина. При этом эритроциты обычно разрушаются. В неразрушенных клетках могут также присутствовать поры, однако меньшего размера – недостаточного для проникновения гемоглобина (м. м. 64500), но не для малых молекул, таких как глутатион (м. м. 307). Эти клетки утрачивают барьерную функцию мембран для глутатиона. И это также может быть тестом на целостность мембраны.

Цель работы – исследовать барьерную функцию мембран для сульфата и глутатиона в суспензиях эритроцитов, замороженных с различными их объемами в комбинированной среде, содержащей декстран и ДМСО.

### Материалы и методы

В работе использовали NaCl (х.ч.), сахарозу (ч.д.а.), декстран с м.м. 35000 («Serva», Германия) и ДМСО («Sigma», США).

Среды замораживания, приготовленные на изотоническом сахарозо-солевом растворе (0,3% NaCl и 6,85% сахарозы), содержали 15% декстрана или 15% декстрана и 5% ДМСО. Как показано ранее [4], при использовании первой среды наблюдался эффект «упаковки» (т.е. проявление большей степени повреждения эритроцитов при замораживании клеточной суспензии с высоким гематокритом по сравнению с низким гематокритом за счет прироста постгипертонического стресса при отогреве), тогда как во второй среде он отсутствовал, при этом устойчивость эритроцитов к осмо-

[23]. It may be suggested that, if the membrane would be damaged,  $SO_4^{2-}$  anions and, accordingly,  $H^+$  ions would penetrate into erythrocytes by other non-specific way. Herewith the evaluated rates of ion transport would exceed such indices for intact cells. Therefore the results of the assessment of  $H^+$  ions and  $SO_4^{2-}$  anions transport might be used to assess barrier function of frozen-thawed erythrocyte membranes. Freezing could lead to appearance of damages in erythrocyte membranes, which during washing-out of cryopreservative would result in formation of hemolytic pores, permeable for hemoglobin. The erythrocytes in this case would be destroyed. In the non-destroyed cells the pores could be present as well, but of lesser size, being not enough for hemoglobin penetration (m.w. 64,500), but passable for small molecules, such as glutathione (m.w. 307). These cells lose barrier function of membranes for glutathione that may be the membrane integrity test as well.

The research aim was to study barrier function of membranes for sulfate and glutathione in suspensions of erythrocytes frozen with different volumes in the combined medium, containing dextran and DMSO.

### Materials and methods

The research was performed using NaCl (chemically pure grade), sucrose (pure for analysis grade), dextran with molecular weight of 35,000 (Serva, Germany) and dimethyl sulfoxide DMSO (Sigma, USA).

The freezing media were based on isotonic sucrose-saline solution (0.3% NaCl and 6.85% sucrose) and contained 15% dextran or 15% dextran with 5% DMSO. It was reported [4] that using of the first medium was accompanied by the ‘packing’ effect (*i.e.* a higher extent of erythrocyte damage after freeze-thawing of cell suspension with a high hematocrit if compared with a low hematocrit due to increase of posthypertonic stress during thawing), and there was no such an effect in the second medium, while the resistance of erythrocytes to osmotic (posthypertonic) stress during thawing was preserved.

Erythrocytes were derived from donor blood of the II group. After removal of plasma the erythromass was twice washed by centrifugation at 3,000 rpm for 3 min in a 10-fold volume of NaCl isotonic solution (0.9%), then it was centrifuged for 10 minutes. Erythrocytes were stored at 4°C as a dense sediment.

The erythrocyte samples (hematocrit of 40%) were incubated with cryopreservative for 30 min at 25°C in steel containers of 1, 10 or 120 ml, thereafter immersed into liquid nitrogen (–196°C) and exposed for 30 min. Then the containers were thawed in water bath at 40°C. Frozen-thawed suspension (1 ml) was diluted 10-fold by warm (37°C) NaCl isotonic solution (0.9%) (0.3 ml/sec with slow agitation) and centrifuged



тическому (постгипертоническому) стрессу при отогреве сохранялась.

Эритроциты получали из донорской крови группы II. После удаления плазмы эритроциты дважды отмывали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 3 мин в 10-кратном объеме изотонического раствора NaCl (0,9%), затем центрифугировали 10 мин. Эритроциты в виде плотного осадка хранили при 4°C.

Образцы эритроцитов (гематокрит 40%) инкубировали с криоконсервантом в стальных контейнерах объемом 1, 10 или 120 мл при 25°C в течение 30 мин, погружали в жидкий азот (-196°C) и выдерживали 30 мин. После этого контейнеры отогревали на водяной бане при 40°C. Размороженную суспензию (1 мл) медленно разводили 1:10 теплым (37°C) изотоническим 0,9%-м раствором NaCl, постоянно перемешивая (скорость добавления 0,3 мл/с), затем центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 мин и удаляли надосадочную жидкость. Процедуру разведения и центрифугирования повторяли еще один раз. Затем клетки трижды отмывали изотоническим раствором NaCl (0,9%) при 37°C без контролируемой скорости разведения.

В суспензиях определяли процент гемолизировавшихся клеток, для этого спектрофотометрически устанавливали количество гемоглобина в супернатанте, измеряя оптическую плотность на длине волны 543 нм. Уровень гемолиза вычисляли по формуле:

$$[A_1/A_2] \times 100,$$

где  $A_1$  – оптическая плотность супернатанта экспериментального образца;  $A_2$  – оптическая плотность при полном гемолизе контрольного образца (после добавления тритон X-100).

Для определения скорости замораживания и отогрева образцов использовали вольтметр, самописец и дифференциальную медь-константановую термопару [7].

Транспорт ионов  $H^+$  в эритроцитах в сульфатной среде (0,11 ммоль/л  $Na_2SO_4$ ) исследовали в термостатируемой ячейке (37°C) с pH-электродом при постоянном перемешивании клеточной суспензии. При внесении эритроцитов в изотонический раствор  $Na_2SO_4$ , не содержащий буферные компоненты, происходит двухфазное изменение pH внешней среды: закисление с последующим защелачиванием. Такое изменение pH связано с обменом внутриклеточного  $Cl^-$  на внеклеточный  $SO_4^{2-}$ . При этом выход ионов  $H^+$  из клетки определяется функционированием цикла Якобса-Стюарта, тогда как их вход непосредственно связан с транспортом  $SO_4^{2-}$  в клетку [23].

at 3000 rot/min for 5 min with the following removal of supernatant. Dilution and centrifugation were repeated. Then the cells were thrice washed with isotonic solution NaCl (0.9%) at 37°C, without regard to their dilution rate.

In the suspensions there was determined a percentage of hemolyzed cells. Therefore hemoglobin amount in a supernatant was spectrophotometrically established, measuring optical density at 543 nm wavelength. Hemolysis percentage was calculated by the formula:

$$[A_1/A_2] \times 100,$$

where  $A_1$  was the optical density of supernatant of experimental sample;  $A_2$  was the optical density after complete hemolysis of control sample (after addition of Triton X-100).

Freezing and thawing rate of samples was measured using voltmeter, plotter and differential copper-constantan thermocouple [7].

Transport of  $H^+$  ions in erythrocytes in sulfate medium (0.11  $\mu\text{mol/l}$   $Na_2SO_4$ ) was investigated in a thermostated well (37°C) equipped with pH electrode, and with continuous agitation of the cell suspension. Introduction of erythrocytes into isotonic solution  $Na_2SO_4$  without buffer components resulted in two-phase pH change of extracellular medium: acidulation and following alkalization. This change of pH was associated with interchange of intracellular  $Cl^-$  with extracellular  $SO_4^{2-}$ . Herewith, the outflux of  $H^+$  ions from cell was determined with Jacobs-Stewart cycle function, whereas their influx was directly associated with transport of  $SO_4^{2-}$  into the cell [23].

Unidirectional flow of  $H^+$  ions was calculated after transformation of the formula [10]:

$$J = k \cdot d \cdot C_i \text{ (}\mu\text{mol} \cdot (3.1 \times 10^{13} \text{ cells} \cdot \text{min})^{-1}\text{)},$$

where  $C_i$  was concentration of intracellular  $Cl^-$ ;  $d$  was the ratio of cell water volume, l, to erythrocyte solid residue, kg;  $k$  was rate constant,  $s^{-1}$  [5].  $C_i$  in the formula was replaced by  $\Delta H$ , i. e. the change of  $H^+$  ion concentration in extracellular medium during exchange of  $Cl^-$  and  $SO_4^{2-}$ . The number of  $3.1 \cdot 10^{13}$  normal cells corresponded to 1 kg of erythrocyte solid residue with  $4.4 \cdot 10^7 \text{ cm}^2$  membrane surface [10].  $H^+$  ion flow  $J_{in/out}$  in and out of the cell may be calculated by the formula:

$$J_{in/out} = k_{in/out} \cdot d \cdot \Delta H \text{ (}\mu\text{mol} \cdot (\text{kg} \cdot \text{s})^{-1}\text{)}.$$

where  $k_{in/out}$  was rate constant of  $H^+$  ions influx/outflux into/out of the cell [5].

Glutathione content in cell sediment was determined using 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) [9]. Erythrocyte sediment (75  $\mu\text{l}$ ) was mixed with water



Однонаправленный поток ионов  $H^+$  вычисляли после преобразования формулы [10]:

$$J = k \cdot d \cdot C_i \text{ (ммоль} \cdot (3,1 \times 10^{13} \text{ клеток} \cdot \text{мин})^{-1}),$$

где  $C_i$  – концентрация внутриклеточного  $Cl^-$ ;  $d$  – отношение объема клеточной воды, л;  $k$  – сухому остатку эритроцитов, кг;  $k$  – константа скорости,  $c^{-1}$  [5]. Множитель  $C_i$  в формуле замещали на  $\Delta H$  – изменение концентрации ионов  $H^+$  во внешней среде при обмене  $Cl^-$  на  $SO_4^{2-}$ . Количество  $3,1 \times 10^{13}$  нормальных клеток соответствует 1 кг сухого остатка эритроцитов с площадью мембран  $4,4 \times 10^7 \text{ см}^2$  [10]. Таким образом, поток ионов  $H^+$  в клетку/из клетки  $J_{in}/J_{out}$  можно рассчитать по формуле:

$$J_{in/out} = k_{in/out} \cdot d \cdot \Delta H \text{ (ммоль} \cdot (\text{кг} \cdot \text{с})^{-1}),$$

где  $k_{in/out}$  – константы скорости входа/выхода ионов  $H^+$  в клетку/из клетки [5].

Концентрацию глутатиона в клеточном осадке определяли с использованием 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислоты (ДТНБ) [9]. Осадок эритроцитов (75 мкл) смешивали с водой (500 мкл), добавляли трихлоруксусную кислоту в концентрации 7% и перемешивали. Полученную смесь центрифугировали в течение 3 мин при 3000 об/мин. Далее 200 мкл супернатанта смешивали с 2,5 мл среды, содержащей 50 ммоль/л трис-НСI и 5 ммоль/л ЭДТА (рН 8,5). К смеси добавляли 200 мкл NaOH (0,1 моль/л), перемешивали и добавляли 25 мкл раствора ДТНБ, приготовленного на метаноле (4 г/л). Реакционную смесь выдерживали 5 мин при 22°C, затем измеряли оптическую плотность при длине волны 412 нм. Содержание глутатиона (мкмоль/г гемоглобина) вычисляли по формуле [9]:

$$[Glut] = OP \times A / (\epsilon \times [Hb]),$$

где  $OP$  – оптическая плотность образца;  $A$  – фактор разведения;  $\epsilon$  – коэффициент молярной экстинкции, равный 11400 моль $^{-1}$ см $^{-1}$ ;  $[Hb]$  – концентрация гемоглобина, г/л.

Статистические расчеты выполняли на основе результатов, полученных на эритроцитах крови 5 доноров. Данные представляли как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка. Для определения статистической достоверности результатов использовали непараметрический метод Манна-Уитни [1].

### Результаты и обсуждение

Замораживание-отогрев эритроцитов в среде, содержащей 15% декстрана, приводит к значительному гемолизу после отмывания криоконсерванта.

(500  $\mu$ l) and supplemented with 7% trichloroacetic acid and agitated. Resulted mixture was centrifuged for 3 min at 3,000 rpm. Then 200  $\mu$ l of supernatant was mixed with 2.5 ml of medium, containing 50  $\mu$ mol/l of Tris-HCl and 5  $\mu$ mol/l of EDTA (pH 8.5). The mixture was supplemented by 200  $\mu$ l of NaOH (0.1 mol/l), agitated and then 25  $\mu$ l of DTNB in methanol (4 g/l) were added. Reaction mixture was exposed for 5 min (22°C) and then optical density was measured at 412 nm. Glutathione content ( $\mu$ mol/l) was calculated by the formula [9]:

$$[Glut] = OD \times A / (\epsilon \times [Hb]),$$

where  $OD$  was the optical density of the sample;  $A$  was the dilution factor;  $\epsilon$  was coefficient of molar extinction equal to 11400 mol $^{-1}$ cm $^{-1}$ ;  $[Hb]$  was hemoglobin concentration (g/l).

Statistical calculations were performed on the base of the results obtained in erythrocytes from 5 donors. The data were presented as a mean  $\pm$  standard error. Non-parametric Mann-Whitney's method was used to determine a statistical significance of the results [1].

### Results and discussion

Erythrocyte freeze-thawing in the medium with 15% dextran resulted in significant hemolysis after washing-out the cryopreservative. If the volume of samples underwent freeze-thawing was elevated from 1 up to 10 and 120 ml a rise in level of cell hemolysis was observed (Table 1). Glutathione content in erythrocytes right after freeze-thawing was not changed if compared with the intact cells, however, after washing-out the cryopreservative a significant decrease of this metabolite content in the remained cells was observed. The obtained results testified to the fact that freeze-thawing of erythrocytes resulted in formation of damages of the membranes which during washing-out the cryopreservative became a hemolytic pores, through which hemoglobin was released. In the undestroyed cells these damages probably were transformed to a smaller pores, impermeable for hemoglobin, but permeable for glutathione. The membranes of these cells lost barrier function for glutathione. Moreover the indices of  $H^+$  ion flow rate in the remained erythrocytes were significantly higher than in the intact cells (Table 1). It should be noted that transport of  $H^+$  ions in erythrocytes in sulfate medium is coupled with chloride-sulfate interchange [23], therefore the risen  $H^+$  ion flow in frozen-thawed cells could be associated with formation of pores, permeable for sulfate.

Erythrocytes frozen-thawed in a combined medium with dextran and DMSO had significantly lower damage rate (Table 2) if compared with the cells, frozen-thawed in the medium, containing dextran (Table 1).



При увеличении объема замораживаемых образцов от 1 до 10 и 120 мл наблюдается увеличение уровня гемолиза клеток (табл. 1). Содержание глутатиона в эритроцитах сразу после замораживания-отогрева не изменяется по сравнению с интактными клетками, однако после отмывания от криоконсерванта отмечается значительное уменьшение концентрации данного метаболита в оставшихся клетках. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при замораживании-отогреве в мембранах эритроцитов образуются повреждения, которые при отмывании криоконсерванта вызывают формирование гемолитических пор, через которые выходит гемоглобин. В оставшихся клетках, очевидно, формируются поры меньшего размера, непроницаемые для гемоглобина, но проницаемые для глутатиона. Мембраны этих клеток утрачивают барьерную функцию по отношению к глутатиону. Кроме того, показатели потока ионов  $H^+$  в оставшихся эритроцитах существенно выше, чем в интактных (табл. 1). Необходимо отметить, что транспорт ионов  $H^+$  в эритроцитах в сульфатной среде сопряжен с обменом хлорида на сульфат [23], поэтому ускорение потока ионов  $H^+$  в замороженных-отогретых клетках, вероятно, связано с образованием пор, проницаемых для сульфата.

Эритроциты, замороженные-отогретые в комбинированной среде с декстраном и ДМСО, имеют меньшую степень повреждения (табл. 2) по сравнению с клетками, замороженными-отогретыми в среде, содержащей только декс-

Glutathione content in erythrocytes after freeze-thawing in combined medium and washing from cryopreservative did not significantly change if compared with the intact cells. The indices of  $H^+$  ion flow in the remained erythrocytes did not significantly exceed the ones of intact cells (Table 2). These results testified to the fact that during freeze-thawing in combined medium with dextran and DMSO the barrier function of membranes in respect of glutathione and  $H^+$  ions (and respectively for sulfate) was insignificantly affected.

**Таблица 1.** Осмотические показатели эритроцитов, замороженных-отогретых в среде с декстраном (15%)

**Table 1.** Osmotic indices of erythrocytes, frozen-thawed in the medium with 15% dextran

Образцы эритроцитов Erythrocyte samples	Объем образцов, мл Volume of samples, ml	Гемолиз, % Hemolysis, %	Содержание глутатиона, мкмоль/г Hb Glutathione content, μmol/g Hb		Поток ионов $H^+$ $H^+$ ion flow	
			До отмывания Prior to washing	После отмывания After washing	$J_{out} \times 10^7$ моль/кг клеток·с mol/kg cells·s	$J_{in} \times 10^7$ моль/кг клеток·с mol/kg cells·s
Замороженные-отогретые Frozen-thawed	1	42,5 ± 3,2	10,3 ± 1,4	4,3 ± 0,6*	8,10 ± 1,10#	5,90 ± 0,83#
	10	50,7 ± 3,5	10,2 ± 1,3	4,5 ± 0,5*	8,30 ± 1,15#	6,10 ± 0,93#
	120	59,0 ± 3,3	10,0 ± 1,6	4,1 ± 0,6*	8,25 ± 1,23#	6,00 ± 0,88#
Интактные Intact	–	–	10,5 ± 1,6		5,43 ± 0,56	4,02 ± 0,42

**Примечания:** \* – статистически достоверно по сравнению с соответствующими показателями содержания глутатиона до отмывания криоконсерванта ( $p < 0,05$ ); # – статистически достоверно по сравнению с интактными клетками ( $p < 0,05$ ).

**Notes:** \* – statistically significant if compared with corresponding indices of glutathione content prior to washing from cryopreservative ( $p < 0.05$ ); # – statistically significant if compared with intact cells ( $p < 0.05$ ).

**Таблица 2.** Осмотические показатели эритроцитов, замороженных в среде с декстраном (15%) и ДМСО (5%)

**Table 2.** Osmotic indices of erythrocytes, frozen in the medium with 15% dextran and 5% DMSO

Образцы эритроцитов Erythrocyte samples	Объем образцов, мл Volume of samples, ml	Гемолиз, % Hemolysis, %	Содержание глутатиона, мкмоль/г Hb Glutathione content, μmol/g Hb		Поток ионов $H^+$ $H^+$ ion flow	
			До отмывания Prior to washing	После отмывания After washing	$J_{out} \times 10^7$ моль/кг клеток·с mol/kg cells·s	$J_{in} \times 10^7$ моль/кг клеток·с mol/kg cells·s
Замороженные-отогретые Frozen-thawed	1	27,0 ± 3,0	9,8 ± 1,4	8,5 ± 1,3	6,56 ± 0,90	4,97 ± 0,73
	10	34,0 ± 3,3	9,2 ± 1,6	8,3 ± 1,4	6,74 ± 0,92	4,95 ± 0,77
	120	42,0 ± 3,0	9,6 ± 1,5	8,8 ± 1,6	6,69 ± 0,99	4,88 ± 0,74
Интактные Intact	–	–	10,5 ± 1,6		5,43 ± 0,56	4,02 ± 0,42

тран (см. табл. 1). Содержание глутатиона в эритроцитах после замораживания-отогрева в комбинированной среде и отмывания от криоконсерванта значительно не изменяется по сравнению с интактными клетками. Показатели потока ионов  $H^+$  в оставшихся эритроцитах существенно не превышают показатели интактных клеток (табл. 2). Эти результаты указывают на то, что при замораживании-отогреве в комбинированной среде с декстраном и ДМСО барьерная функция мембран для глутатиона и ионов  $H^+$  (соответственно для сульфата) нарушается незначительно. Отмечается также повышение уровня гемолиза эритроцитов при увеличении объема замораживаемых образцов от 1 до 10 и 120 мл (табл. 2).

Увеличение объема замораживаемых образцов эритроцитов приводит к уменьшению скорости охлаждения и отогрева (табл. 3). Поэтому результаты замораживания разных объемов эритроцитов могут использоваться для оценки влияния режимов замораживания на исследуемые показатели клеток. Уменьшение скорости замораживания и отогрева в комбинированной среде при использованных режимах не влияет на исследованные показатели потока ионов  $H^+$  и барьерной функции мембран для глутатиона в отмытых клетках (табл. 2). Ранее было показано, что замораживание различных типов клеток в комбинированном криоконсерванте с непроникающим (ГЭК) и проникающим (ДМСО) криопротекторами устраняет необходимость программного замораживания и позволяет замораживать клетки без контроля скорости охлаждения [11, 16, 18, 25, 26].

Luo K. и соавт. [17] замораживали мононуклеарные клетки костного мозга в средах с ДМСО (5%) + ГЭК (5%) и ДМСО (10%) до  $-80^{\circ}C$  с последующим погружением в жидкий азот без контроля скорости замораживания при применении первого криоконсерванта и ступенчатого охлаждения – второго. Сравнение кривых замораживания показало, что при использовании комбинированного криоконсерванта уменьшается степень переохлаждения клеточных образцов. Clapisson G. и соавт. [11] замораживали стволовые клетки периферической крови с использованием двухступенчатого режима охлаждения в среде с ДМСО (10%) или ГЭК (3%) + ДМСО (5%) без контроля скорости замораживания до  $-80^{\circ}C$ . Показатели жизнеспособности размороженных клеток были выше после применения комбинированного криоконсерванта [11]. Использование комбинированной среды ДМСО (5%) + ГЭК (5%) при за-

There was also observed an increase of erythrocyte hemolysis level along with the elevation of volume from 1 up to 10 and 120 ml of samples underwent freezing (Table 2).

The bigger volume of erythrocyte samples undergoing freezing increased the lower are the cooling and thawing rates (Table 3). The results of freezing of erythrocytes samples with different volumes may be used for evaluation of effect of freezing regimens on the studied indices of cells. Reduction of freezing and thawing rates in a combined medium under the used regimens did not affect the studied indices of  $H^+$  ion flow and barrier function of membranes in respect of glutathione in washed cells (Table 2). It was also reported by other authors that freezing different types of cells in combined cryopreservative containing non-penetrating (HES) and penetrating (DMSO) cryoprotectants eliminated the necessity of controlled rate freezing and enabled to freeze the cells without a programmable freezer [11, 16, 18, 25, 26].

Luo K. *et al.* [17] performed freezing of bone marrow mononuclear cells in the media with DMSO (5%) + HES (5%) and DMSO (10%) down to  $-80^{\circ}C$  with the following plunging into liquid nitrogen without control of freezing rate in the case of the first cryopreservative and stepwise cooling when using the second one. A comparison of freezing curves showed that the supercooling rate of cell samples was reduced in the case of combined cryopreservative. Clapisson G. *et al.* [11] investigated the freezing of stem cells from peripheral blood in two-step cooling regimen using the medium with DMSO (10%) or HES (3%) + DMSO (5%) without control of freezing rate down to  $-80^{\circ}C$ . The post-thaw viability indices of cells were higher in the case of combined cryopreservative [11]. Application of the combined medium DMSO (5%) + HES (5%)

**Таблица 3.** Скорости охлаждения и отогрева образцов эритроцитов различного объема в среде с декстраном (15%) и ДМСО (5%)

**Table 3.** Cooling and thawing rates of erythrocyte samples with different volumes in the medium with 15% dextran and 5% DMSO

Объем образцов, мл Volume of samples, ml	Скорость охлаждения до $-25... -35^{\circ}C$ , град/мин Cooling rate down to $-25 - 35^{\circ}C$ , deg/min	Скорость охлаждения ниже $-25... -35^{\circ}C$ , град/мин Cooling rate below $-25... - 35^{\circ}C$ , deg/min	Начальная скорость отогрева, град/мин Initial thawing rate, deg/min
1	180 – 300	1000 – 1200	900 – 1200
10	50 – 70	800 – 1100	850 – 1000
120	20 – 30	500 – 700	400 – 500



мораживании клеток поджелудочной железы позволило проводить процедуру замораживания-отогрева без программного замораживателя в отличие от среды с ДМСО (10%) [18].

Таким образом, комбинирование в криоконсерванте ДМСО и ГЭК позволяет упростить технологию замораживания и в некоторых случаях улучшить качественные показатели замороженных-отогретых клеток.

Для сохранения клеток при замораживании необходимы специальные подходы, включающие подбор вида и концентрации криопротектора, а также скорости охлаждения до промежуточной температуры ниже 0°C для обеспечения оптимальной дегидратации клеток и минимизации отрицательного воздействия последующего охлаждения до более низкой температуры. Выбор оптимальной программы замораживания основан на осмотическом поведении клеток. Чтобы предотвратить образование внутриклеточных кристаллов льда, степень переохлаждения клеточных образцов не должна превышать ~2°C. Оптимальная скорость охлаждения определяется проницаемостью клеточных мембран для молекул воды и криопротектора, осмотически активным объемом и поверхностно-объемным отношением клеток [6, 29]. Температура начала нуклеации внутриклеточного льда связана со степенью переохлаждения цитоплазмы клеток [21], концентрацией криопротектора и степенью дегидратации клеток [27]. Кристаллизация части внутриклеточной воды (5–7%) может быть не опасной для клеток [12]. При замораживании клеток в комбинированной среде ДМСО + ГЭК выявлено уменьшение степени переохлаждения по сравнению с замораживанием в среде, содержащей только ДМСО [17].

При медленном замораживании эритроциты концентрируются в каналах льда, в которых раздавливаются и гемолизируются, а при быстром – распределяются в толще льда. На основании этого Pegg D.E. и Diaper M.P. заключили, что увеличение степени повреждения эритроцитов при быстром замораживании суспензий с высокой концентрацией клеток не связано с их механической деформацией образующимися кристаллами льда [20]. При замораживании суспензий эритроцитов с высоким гематокритом в сравнении с низким повышается вероятность образования внутриклеточных кристаллов льда [20]. Однако повреждение клеток внутриклеточными кристаллами льда может быть не только механическим, но и осмотическим при их плавлении в ходе медленного отогрева [13]. При быстром размораживании суспензии с высокой концентрацией клеток степень повреждения увеличивается за счет осмотического воздействия на конечной стадии быстрого размораживания вследствие таяния

for freezing pancreas cells enabled to perform freeze-thawing without a programmable freezer unlike the medium with DMSO (10%) [18].

Thus, using of combined DMSO and HES cryopreservative enabled to simplify freezing technology and in some cases to improve post-thaw qualitative indices of cells.

Preservation of cells during freezing requires special approaches, including selection of type and concentration of cryoprotectant, as well as the rate of cooling down to transient temperature below 0°C to provide optimal cell dehydration and minimization of negative effect of the following cooling down to ultralow temperatures. Selection of optimal freezing program is based on osmotic behavior of cells. To prevent the formation of intracellular ice crystals the supercooling in cell samples should not exceed ~2°C. Optimal cooling rate is determined by permeability of cell membranes for water and cryoprotectant molecules, as well as osmotically active volume and surface-to-volume ratio of cells [6, 29]. Temperature of initiation of intracellular ice nucleation is associated with the cell cytoplasm supercooling [21], cryoprotectant concentrating and cell dehydration rate [27]. Partial crystallization of intracellular liquids (5–7%) could be not dramatic for cells [12]. Freezing of cells in DMSO + HES combined medium was reported as accompanied with a lower supercooling if compared with case of medium based on DMSO [17].

Slow freezing is characterized by concentrating of erythrocytes inside channels between ice crystals, they undergo mechanical stress and hemolyze, and *vice versa* during rapid freezing the cells are scattered inside ice crystals. On that basis Pegg D.E. and Diaper M.P. concluded that the increasing of erythrocyte damage rate during rapid freezing of suspensions with a high cell concentration is not associated with their mechanical deformation by formed ice crystals [20]. When freezing the erythrocyte suspensions with a high hematocrit unlike the low one the probability of intracellular ice crystal formation is increased [20]. Moreover, it is suggested that cell damage due to intracellular ice crystals might be not only mechanical, but also osmotic following from melting of the crystals during slow warming [13]. Rapid thawing of suspension with a high cell concentration is characterized by rised cell damage rate due to osmotic effect resulted from melting of intracellular ice a bulk of which was formed by intracellular liquid [14].

Thus, during rapid freeze-thawing of erythrocyte suspensions with a high hematocrit the higher damage rate may be stipulated by the increasing of osmotic stress during thawing if compared with suspensions with the low hematocrit.

Rapid freeze-thawing in a combined non-penetrating and penetrating cryoprotectant mixture was shown as





внеклеточного льда, существенная часть которого была образована из внутриклеточной воды [14].

Таким образом, при быстром замораживании-отогреве суспензий эритроцитов с высоким гематокритом, в отличие от суспензий с низким гематокритом, большая степень повреждения клеток может быть обусловлена увеличением осмотического стресса при отогреве.

В условиях быстрого замораживания-отогрева сочетание в среде непроникающих и проникающих крипротекторов приводит к устранению эффекта «упаковки», вероятно, вследствие ослабления осмотического стресса при отогреве [4].

Считается, что крипротекторные свойства полимеров в большей степени определяются их способностью снижать температуру кристаллизации раствора при замораживании (до  $-35^{\circ}\text{C}$ ), а не прямым воздействием на клеточную мембрану [8]. Наряду с криозащитным эффектом концентрирование полимеров при вымораживании воды производит гипертонический стресс на клетки [8]. Криозащитный эффект проникающих крипротекторов связан с замедлением концентрирования раствора и уменьшением степени дегидратации клеток [8], однако проникающие крипротекторы (глицерин и ДМСО) не способны к эффективной криозащите клеток в ходе быстрого замораживания из-за высокой вероятности образования внутриклеточного льда [19]. Включение в состав среды непроникающего крипротектора может способствовать достижению оптимальной дегидратации клеток и соответственно снижению вероятности образования кристаллов льда внутри клетки. При замораживании клеточных суспензий в присутствии непроникающих крипротекторов необходимы высокие скорости охлаждения для уменьшения времени действия гипертонического стресса на клеточные мембраны [8]. Включение в среду проникающего крипротектора и его поступление в клетки будут противодействовать чрезмерной дегидратации и соответственно уменьшать гипертонический стресс. Следовательно, комбинирование в криозащитной среде проникающих и непроникающих крипротекторов является эффективным подходом для коррекции отрицательного влияния обоих компонентов при замораживании-отогреве клеточных образцов.

Таким образом, установлено, что при использовании комбинированной среды декстран + ДМСО, независимо от объема замораживаемых образцов эритроцитов и режимов замораживания-отогрева, клетки, отмытые от криоконсерванта, сохраняют барьерную функцию мембран для ионов  $\text{H}^+$  (соответственно для сульфата) и глутатиона. Полученные результаты позволяют предположить, что включение в среду с декстраном ДМСО

not accompanied with ‘packing’ effect, seemingly due to the weakness of osmotic stress when thawing [4].

It is suggested that cryoprotective properties of polymers are determined by their capacity to reduce the crystallization temperature when freezing the solution (down to  $-35^{\circ}\text{C}$ ), rather than with direct effect on the cell membrane. Along with cryoprotective effect the concentrating of polymers during water crystallization results in a hypertonic stress on cells [8]. Cryoprotective effect of penetrating cryoprotectants is associated with slowing-down of solution concentrating and reduction of cell dehydration rate [8], however, penetrating cryoprotectants (*e. g.* glycerol and DMSO) are not capable of cell protection during rapid freezing due to a high probability of intracellular ice formation [19]. Supplementation of medium with non-penetrating cryoprotectant may contribute to optimal cell dehydration and correspondingly to reduce the probability of ice crystal formation inside the cell. Freezing of cell suspensions in the presence of non-penetrating cryoprotectants requires high cooling rates to reduce the period of hypertonic stress effect on cell membranes [8]. Introduction of penetrating cryoprotectant into the medium and its penetration into cells would prevent an extreme dehydration and correspondingly decrease a hypertonic stress. Therefore, combination of penetrating and non-penetrating cryoprotectants in a cryoprotective medium is an effective approach to balance negative effect of both components during freeze-thawing of cell samples.

Finally, it was established that using dextran + DMSO combined medium allowed to preserve barrier functions of membranes in respect of  $\text{H}^+$  ions (and respectively for sulfate) and glutathione in the cells washed from cryopreservative, and this effect did not depend on volume of frozen-thawed erythrocyte samples and freeze-thawing regimens. The obtained results allowed to suggest that supplementation of the dextran based medium with DMSO and its penetration into the cells resulted in a reduced hypertonic stress during freezing and preserved resistance of erythrocyte membranes to post-hypertonic effect during thawing, providing preservation of cell osmotic properties after removal of cryopreservative.

## Conclusions

Freeze-thawing of erythrocyte suspension in the medium with dextran (15%) resulted in high amount of damaged cells. The remaining cells were characterized by impaired barrier function of membranes in respect to sulfate and glutathione revealed after cryopreservative wash-out.

Supplementation of dextran based medium with DMSO (5%) significantly reduced the cell damage rate and resulted in preservation of membrane barrier function.



и его поступление в клетки приводят к ослаблению гипертонического стресса при замораживании и сохранению устойчивости мембран эритроцитов к постгипертоническому воздействию при размораживании, что обеспечивает сохранение осмотических свойств отмытых от криоконсерванта клеток.

### Выводы

В суспензии эритроцитов, замороженных-отогретых в среде с декстраном (15%), отмечено большое количество разрушенных клеток, а в оставшихся клетках при отмывании криоконсерванта нарушается барьерная функция мембран для сульфата и глутатиона.

Включение в среду с декстраном ДМСО (5%) значительно уменьшило степень повреждения клеток и привело к сохранению барьерной функции мембран.

Уменьшение скорости замораживания и отогрева в комбинированной среде с декстраном и ДМСО при увеличении объема замораживаемых образцов не ухудшает показатели барьерной функции мембран отмытых после замораживания клеток.

### Литература

1. Ашмарин И.П., Васильев И.П., Амбросов В.А. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов. – Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1975. – 76 с.
2. Межидов С.Х., Беляева И.М., Воротилин А.М., Моисеев В.А. Влияние сочетания поливинилпирролидона и 1,2-пропандиола на сохранность эритроцитов при криоконсервировании // Проблемы криобиологии. – 1996. – №2. – С. 22–25.
3. Межидов С.Х., Моисеев В.А. Влияние сочетания высокомолекулярных криопротекторов с 1,2-пропандиолом на сохранность эритроцитов при криоконсервировании // Проблемы криобиологии. – 1995. – №3. – С. 46–48.
4. Рамазанов В.В. Влияние комбинированных сред на повреждение эритроцитов, замороженных с различным гематокритом // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т. 16, №2. – С. 155–163.
5. Рамазанов В.В., Забродский Р.Ф., Найдюк Я.Ю., Бондаренко В.А. Функционирование системы транспорта ионов H<sup>+</sup> при модификации мембран эритроцитов в условиях моделирующих условия замораживания // Вісник проблем біології і медицини. – 2010. – Вип. 3. – С. 186–192.
6. Сакун О.В. Аналіз ефективності криоконсервування клітинних суспензій з постійною та змінною швидкістю охолодження: Дис. ... канд. біол. наук. – Харків, 2009. – 120 с.
7. Справочник по физико-техническим основам криогеники / Под ред. М.П.Малкова. – М.: Энергия, 1973. – 392 с.
8. Bakhach J. The cryopreservation of composite tissues. Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues // Organogenesis. – 2009. – Vol. 5, №3. – P. 119–126.
9. Beutler E. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. – New York: Grune&Stratton, 1975. – 160 p.
10. Brahm J. Temperature-dependent changes of chloride transport kinetics in human red cells // J. Gen. Physiol. – 1977. – Vol. 70, №3. – P. 283–306.

Decrease of freezing and thawing rates when using dextran and DMSO combined medium observed after increasing the volume of samples did not impaired the post-thaw and post-wash osmotic properties of cells.

### References

1. Ashmarin I.P., Vasil'ev I.P., Ambrosov V.A. Express methods of statistical analysis and planning of experiments.– Leningrad, 1975.– 76 p.
2. Mezhidov S.Kh., Belyaeva I.M., Vorotilin A.M., Moiseev V.A. Effect of combination of polyvinylpyrrolidone and 1,2-propanediol to the erythrocytes survival at cryopreservation// Problems of Cryobiology.– 1996.– N2. – P. 22–25.
3. Mezhidov S.Kh., Moiseev V.A. Effect of combination of high molecular cryoprotectants with 1,2–propanediol to the erythrocytes survival at cryopreservation // Problems of Cryobiology.– 1995.– N3.– P. 46–48.
4. Ramazanov V.V. Effect of combined media to erythrocytes destruction frozen with different hematocrit // Problems of Cryobiology.– 2006.– Vol. 16, N2.– P. 155–163.
5. Ramazanov V.V., Zabrodsky R.F., Naydyuk Ya.Yu., Bondarenko V.A. Functioning of H<sup>+</sup> ion transport system during modification of erythrocyte membranes under conditions, modeling freezing ones // Visnyk Problem Biologii i Medytsyny.– 2010.– Issue 3.– P. 186–192.
6. Sakun O.V. Analysis of cryopreservation efficiency of cell suspensions with constant and changed cooling rate: Thesis of Candidate of Biol. Sciences.– Kharkiv, 2009.– 120 p.
7. Reference book for physical and technological principals of genetics // Ed. by M.P. Malkova.– Moscow: Energiya, 1973.– 392 p.
8. Bakhach J. The cryopreservation of composite tissues. Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues // Organogenesis. – 2009. – Vol. 5, N3. – P. 119–126.
9. Beutler E. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. – New York: Grune&Stratton, 1975. – 160 p.
10. Brahm J. Temperature-dependent changes of chloride transport kinetics in human red cells // J. Gen. Physiol. – 1977. – Vol. 70, N3. – P. 283–306.
11. 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.
12. Devireddy R.V., Swanlund D.J., Olin T. et al. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry // Biol Reprod. – 2002. – Vol. 66, №1. – P. 222–231.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Luo K., Wu G., Wang Q. et al. Effect of dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch in the preservation of fractionated human



11. Clapisson G., Salinas C., Malacher P. et al. Cryopreservation with hydroxyethylstarch (HES) + dimethylsulphoxide (DMSO) gives better results than DMSO alone // *Bull. Cancer.* – 2004. – Vol. 91, №4. – P. E97–102.
12. Devireddy R.V., Swanlund D.J., Olin T. et al. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry // *Biol. Reprod.* – 2002. – Vol. 66, №1. – P. 222–231.
13. 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, №3. – P. 273–286.
14. 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, №6. – P. 669.
15. Lionetti F.J., Luscinskas F.W., Hant S.M. et al. Factors affecting the stability of cryogenically preserved granulocytes // *Cryobiology.* – 1980. – Vol. 17, №3. – P. 297–310.
16. 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, №5. – P. 670–673.
17. 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, №4. – P. 349–354.
18. 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, №4. – P. 1133–1134.
19. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates // *Cryobiology.* – 1977. – Vol. 14, №3. – P. 251–272.
20. Pegg D.E., Diaper M.P. The packing effect in erythrocyte freezing // *Cryo-Letters.* – 1983. – Vol. 4, №2. – P. 129–136.
21. Pitt R.E., Chandrasekaran M., Parks J.E. Performance of a kinetic model for intracellular ice formation based on the extent of supercooling // *Cryobiology.* – 1992. – Vol. 29, №3. – P. 359–373.
22. 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, №2. – P. 264–272.
23. Romano L., Passow H. Characterization of anion transport system in trout red blood cell // *Am. J. Physiol.* – 1984. – Vol. 246. – P. 330–338.
24. 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, №11. – P. 1043–1051.
25. 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, №4. – P. 974–978.
26. 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, №1. – P. 17–24.
27. Tsuruta T., Ishimoto Y., Masuoka T. Effects of glycerol on intracellular ice formation and dehydration of onion epidermis // *Ann. N.-Y. Acad. Sci.* – 1998. – Vol. 858. – P. 217–226.
28. 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, №2. – P. 153–166.
29. Woelders H., Chaveiro A. Theoretical prediction of 'optimal' freezing programmes // *Cryobiology.* – 2004. – Vol. 49, №3. – P. 258–271.
30. marrow cells // *Cryobiology.* – 1994. – Vol. 31, №4. – P. 349–354.
18. 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, №4. – P. 1133–1134.
19. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates // *Cryobiology.* – 1977. – Vol. 14, №3. – P. 251–272.
20. Pegg D.E., Diaper M.P. The packing effect in erythrocyte freezing // *Cryo-Letters.* – 1983. – Vol. 4, №2. – P. 129–136.
21. Pitt R.E., Chandrasekaran M., Parks J.E. Performance of a kinetic model for intracellular ice formation based on the extent of supercooling // *Cryobiology.* – 1992. – Vol. 29, №3. – P. 359–373.
22. 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, №2. – P. 264–272.
23. Romano L., Passow H. Characterization of anion transport system in trout red blood cell // *Am. J. Physiol.* – 1984. – Vol. 246. – P. 330–338.
24. 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, №11. – P. 1043–1051.
25. 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, №4. – P. 974–978.
26. 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, №1. – P. 17–24.
27. Tsuruta T., Ishimoto Y., Masuoka T. Effects of glycerol on intracellular ice formation and dehydration of onion epidermis // *Ann. N.-Y. Acad. Sci.* – 1998. – Vol. 858. – P. 217–226.
28. 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, №2. – P. 153–166.
29. Woelders H., Chaveiro A. Theoretical prediction of 'optimal' freezing programmes // *Cryobiology.* – 2004. – Vol. 49, №3. – P. 258–271.

