

## Влияние комбинированных сред на повреждение эритроцитов, замороженных с различным гематокритом

UDC 57.043:612.111:547.422

V.V. RAMAZANOV

### Effect of Combined Media on Damage of Erythrocytes, Frozen with Different Hematocrit Values

Исследовали повреждение эритроцитов, замороженных с низким (0,8%) и высоким (40%) гематокритом в средах с криопротекторами: непроницаемыми – полиэтиленгликоль с м.м. 1500 и 2000 (ПЭГ-1500, ПЭГ-2000), декстраны и проникающими – глицерин, диметилсульфоксид, 1,2-пропандиол, ПЭГ-400, глюкоза. Показано, что в сахарозо-солевой среде замораживание эритроцитов с высоким гематокритом дает больший уровень повреждения клеток по сравнению с низким гематокритом. Комбинирование указанной среды с непроницаемыми криопротекторами не устраняет эффект “упаковки”. В то же время проникающие криопротекторы устраняют его. Полученные результаты указывают на то, что для устранения повреждения, связанного с высокой плотностью клеток в среде замораживания, необходимо комбинирование сахарозы с проникающими криопротекторами.

**Ключевые слова:** эритроциты, комбинированные криоконсерванты, эффект “упаковки”.

Досліджували ушкодження еритроцитів, заморожених з низьким (0,8%) і високим (40%) гематокритом у середовищах з криопротекторами: непроницаючими – поліетиленгліколь з м.м. 1500 та 2000 (ПЕГ-1500, ПЕГ-2000), декстрани і проникаючими – гліцерин, диметилсульфоксид, 1,2-пропандіол, ПЕГ-400, глюкоза. Доведено, що в сахарозо-солевому середовищі при заморожуванні з високим гематокритом рівень ушкодження клітин вищий, ніж з низьким. Комбінування вказаного середовища з непроницаючими криопротекторами не усуває ефекту „упаковки”. В той же час проникаючі криопротектори усувають його. Отримані результати вказують на те, що для усунення пошкодження, пов'язаного з високою щільністю клітин в середовищі заморожування, потрібно комбінування сахарози та проникаючих криопротекторів.

**Ключові слова:** еритроцити, комбіновані криоконсерванти, ефект „упаковки”.

Damage of erythrocytes, frozen with low (0.8%) and high (40%) hematocrit values in media with non-penetrative (polyethylene glycol with molecular mass of 1500 and 2000 (PEG-1500, PEG-2000), dextrans) and penetrative (glycerol, dimethylsulfoxide, 1,2-propane diol, PEG-400, glucose) cryoprotectants has been studied. Freezing of erythrocytes with high hematocrit in sucrose-saline medium was demonstrated as resulting in higher cell damages if to compare with a low hematocrit. Combining this mentioned medium with non-penetrative cryoprotectant does not eliminate the “packing” effect, while the penetrative ones realize it. The results obtained indicate to the fact, that in order to eliminate the damage, relating to high cell density in freezing medium the combination of sucrose with penetrative cryoprotectants is needed.

**Key-words:** erythrocytes, combined cryopreservatives, “packing” effect.

При использовании гидроксипропилированного крахмала (ГЭК) для получения гранулоцитов и их последующего криоконсервирования с добавлением ДМСО выявлено, что остаточный ГЭК предотвращает набухание клеток, освобождение лизосомальных ферментов и нуклеопротеинов после размораживания [10]. Сравнение результатов консервирования клеток костного мозга под защитой диметилсульфоксида (ДМСО) с концентрацией 10% и смеси 5% ДМСО + 6% ГЭК показывает, что комбинация проникающего и непроницающего криопротекторов приводит к повышению жизнеспособности клеток и предотвращению их агрегации после размораживания, а также снимает необходимость контроля скорости охлаждения

When using hydroxyethyl starch (HES) for obtaining granulocytes and their following cryopreservation with DMSO adding, a residual HES was found-out to prevent cell swelling, release of lysosomal enzymes and nucleoproteins after freeze-thawing [10]. Comparing bone marrow frozen cells with 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) and 5% DMSO+6% HES concentrations demonstrates that a combination of penetrative and non-penetrative cryoprotectants results in an increase in cell viability and prevention of their aggregation after freeze-thawing, as well as makes it unnecessary to control cooling rate [6, 18, 19]. In case of erythrocytes and hepatocytes the combination of high-molecular polymers with penetrative cryoprotectants enables to reduce the concentration of latter

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: Рамазанов В.В., 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: Ramazanov V.V., 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 4135, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

дения [6, 18, 19]. В случае эритроцитов и гепатоцитов сочетание высокомолекулярных полимеров с проникающими криопротекторами позволяет снизить концентрацию последних [2, 3] и повысить скорость замораживания без снижения показателей жизнеспособности [1].

Данные литературы указывают на общие причины дополнительного повреждения различных клеток, которое можно предотвратить при комбинированной защите высокомолекулярными полимерами и проникающими криопротекторами. Анализ литературы показывает, что одной из причин повреждения клеток может быть их высокая концентрация в средах криоконсервирования [7, 12, 15-17, 20]. При медленном замораживании эритроциты концентрируются в каналах между растущими кристаллами льда, где сдавливаются и разрушаются [15]. Снижение гематокрита в среде замораживания вызывает положительный эффект, при этом установлено, что эффект концентрации эритроцитов обусловлен скоростями замораживания и размораживания, а также концентрацией глицерина в консервирующей среде [7, 16, 17, 20]. Такие результаты указывают на то, что отрицательное влияние высокой концентрации клеток на их сохранность при замораживании связано не только с дополнительными эффектами концентрирования раствора и образования льда, но и влиянием скоростей замораживания и размораживания на размеры каналов, в которых клетки контактируют между собой и растущими кристаллами льда [17]. При низком гематокрите сохранность эритроцитов в большей степени зависит от количества незамерзшей жидкости, чем концентрации солей в ней, тогда как при высоком гематокрите сохранность определяется указанными факторами. Значительное повреждение отмечается в условиях максимальной дегидратации и максимально плотных межклеточных контактов, что соответствует гиперконцентрированию солей при замораживании эритроцитов с высоким гематокритом [12]. При быстром замораживании уменьшается время воздействия высоких концентраций растворенных веществ. Кроме того, в этом случае клетки дисперсно распределены внутри образовавшихся кристаллов льда, тем не менее отрицательное влияние повышения концентрации клеток выявляется и в этих условиях. Поэтому был сделан вывод, что механизм дополнительного прироста повреждения клеток при быстром замораживании отличается от такового при медленном [14].

Цель работы – определить влияние непроникающих и проникающих криопротекторов, а также их комбинаций на отрицательный эффект высокой концентрации клеток – эффект “упаковки”, выявленный при замораживании эритроцитов в сахарозо-

[2, 3] and augment freezing rate with no reduction in indices of viability [1].

Literature data indicate to the common reasons of additional damage of different cells, which can be prevented if combining protection with high-molecular polymers and penetrative cryoprotectants. Analysis of literature demonstrates that a high cell concentration in cryopreservation media can be one of the reasons of their damaging [7, 12, 15-17, 20]. At slow freezing the erythrocytes under growing ice crystal effect are concentrated in the frozen channels, where they are compressed and destroyed [15]. Hematocrit decrease in freezing medium causes a positive effect, at the same time the one of cell concentration was established to be stipulated by freezing and thawing rates, as well as by glycerol concentration in a preservative medium [7, 16, 17, 20]. Such results point to the fact that a negative effect of cell density on their integrity at freezing is related not only to additional effects of solution and ice concentration, but to that of freezing and thawing rates on sizes of liquid channels as well, where cells have contacts with other cells and growing ice crystals [17]. Cell preservation at a low hematocrit mostly depends the amount of unfrozen liquid, than salt concentration in it, meanwhile at a high hematocrit the integrity is determined by two mentioned factors. Considerable damage is noted under maximum dehydration and maximally tight contact between cells, that corresponds to salt hyperconcentration during erythrocyte freezing with a high hematocrit [12]. At a rapid freezing the effect time of salt high concentrations reduces. In addition, in this case cells are dispersively distributed inside formed ice crystals, though a negative effect of increase in cell concentration is revealed under these conditions as well. Therefore there was concluded about differing of the mechanism of additional increase of cell damage from the one at slow freezing [14].

The work was aimed to determine the effect of non-penetrative and penetrative cryoprotectants, as well as their combination on negative effect of high cell density (“packing” effect), found-out during erythrocyte freezing in sucrose-saline medium. The performed experiments demonstrated that for avoiding additional damages during freezing, being stipulated by a high hematocrit, a slight amount of penetrative cryoprotectants together with sucrose was sufficient.

### Materials and methods

NaCl (“chemically pure”), sucrose (“pure for analysis”), glucose (“pure for analysis”), polyethylene glycols (PEG) with 400, 1500, 2000 molecular mass (Merck); dextrans with 10000 (Dex-10) and 35000 (Dex-35) molecular mass (Serva); glycerol (Germany); 1,2-propane diol (1,2-PD); dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma) were used in the work. Human erythrocytes

солевой среде. Проведенные эксперименты показали, что для избежания дополнительных повреждений при замораживании, обусловленных высоким гематокритом, необходимо присутствие в среде замораживания проникающих криопротекторов в сочетании с сахарозой.

### Материалы и методы

В работе использовали NaCl (х.ч.), сахарозу (ч.д.а.), глюкозу (ч.д.а.); полиэтиленгликоли (ПЭГ) с молекулярными массами 400, 1500, 2000 (Merck); декстран с молекулярными массами 10000 (Декс-10) и 35000 (Декс-35, Serva); глицерин (Германия), 1,2-пропандиол (1,2-ПД), ДМСО (Sigma). Эритроциты человека получали из донорской крови четырехкратным отмыванием раствором, содержащим 0,15 М NaCl, 10 мМ трис, pH 7,6 (среда 1). Для получения растворов с различным содержанием NaCl и сахарозы среду 1 смешивали с раствором, содержащим 0,3 М сахарозы, 10 мМ трис, pH 7,6. При этом получали следующий состав среды: 100 мМ NaCl + 100 мМ сахарозы; 75 мМ NaCl + 150 мМ сахарозы; 50 мМ NaCl + 200 мМ сахарозы, 25 мМ NaCl + 250 мМ сахарозы. Растворы криопротекторов в концентрациях 5, 10 или 15% готовили на среде 1 или среде с 50 мМ NaCl, 200 мМ сахарозы (среда 2) или 450 мМ NaCl, 100 мМ сахарозы (среда 3), которые включали 10 мМ трис, pH 7,6. Эритроциты с гематокритом 8% инкубировали 30 мин при 37°C в среде 1, содержащей проникающие криопротекторы в концентрации 5%. Образцы эритроцитов в пластиковых пробирках со средами замораживания объемом 1 мл и гематокритом 0,8 и 40% погружали в жидкий азот и выдерживали 15 мин, затем переносили на водяную баню при 40°C (процедура быстрого замораживания и размораживания). После размораживания образцы центрифугировали, степень гемолиза определяли спектрофотометрически при длине волны 543 нм.

На основании результатов, полученных на эритроцитах от пяти доноров, рассчитывали математическое ожидание и дисперсию случайной величины.

### Результаты и их обсуждение

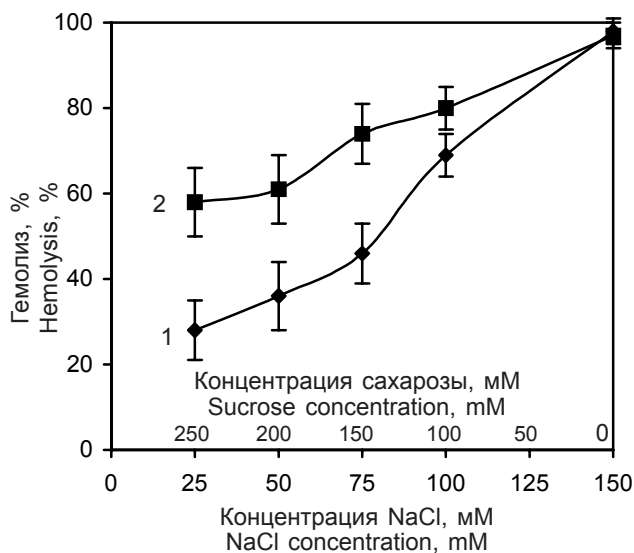
Снижение концентрации NaCl при ее замещении на сахарозу приводит к уменьшению степени гемолиза (рис. 1), что, видимо, связано с менее интенсивным нарастанием концентрации NaCl и стабилизирующим воздействием сахарозы на мембрану в условиях замораживания [5]. Степень повреждения при замораживании с низким гематокритом ниже, чем с высоким, при этом разница степени повреждения тем больше, чем ниже концентрация NaCl в растворе. Это может быть связано с ростом эффектов концентрирования раствора

were derived from donor blood by means of four-fold washing-out with the solution, containing 0.15 M NaCl, 10 mM Tris, pH 7.6 (medium-1). In order to obtain solutions with different NaCl and sucrose content the medium-1 was mixed with the solution, containing 0.3M sucrose, 10 mM Tris, pH 7.6. At the same time the following medium composition was obtained: 100 mM NaCl + 100 mM sucrose; 75 mM NaCl + 150 mM sucrose; 50 mM NaCl + 200 mM sucrose; 25 mM NaCl + 250 mM sucrose. Cryoprotectant solutions in 5, 10 or 15% concentrations were prepared on medium-1 or the medium, containing 50 mM NaCl, 200 mM sucrose (medium-2) or 450 mM NaCl, 100 mM sucrose (medium-3), which comprised 10 mM Tris, pH 7.6. Erythrocytes with 8% hematocrit were incubated for 30 min at 37°C in medium-1, containing penetrative cryoprotectants under 5% concentration. Erythrocyte samples in plastic vials with freezing media in 1 ml volume and 0.8 and 40% hematocrit were immersed into liquid nitrogen and exposed for 15 min, then transferred on water bath at 40°C (rapid freeze-thawing procedure). Samples after freeze-thawing were centrifuged, hemolysis extent was spectrophotometrically determined at 543 nm wavelength.

Basing on the results obtained in erythrocytes of five donors the mathematical expectation and standard dispersion were calculated.

### Results and discussion

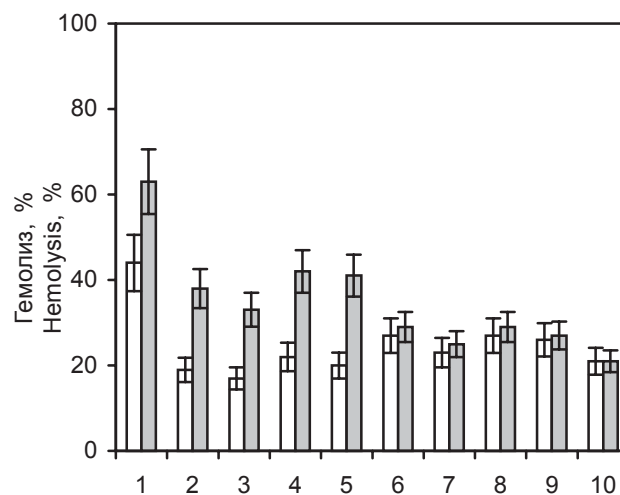
Decrease in NaCl concentration when substituting it to sucrose results in a reduction of hemolysis rate (Fig. 1), that is apparently related to less intensive increase in salt hyperconcentration and sucrose stabilising effect on membrane under freezing conditions [5]. A degree of damage during freezing with low hematocrit is less than if using a high one, at the same time the difference of degree of damage is higher with lower salt concentration. This can be related to an increase in effects of solution concentration and ice amount, which is additionally formed during freezing with high hematocrit [12, 16]. Osmotic influence of sucrose on cell density effect during freezing should be taken into account [13]. The presence of polymer or penetrative cryoprotectants in freezing medium results in a decrease in degree of cell damage during freezing. However for penetrative cryoprotectants a significant difference between the levels of erythrocytes hemolysis during their freezing with low and high hematocrit values is no longer revealed (Fig. 2). In addition, penetrative cryoprotectants eliminate a negative effect of high cell density in the media with polymers (Fig. 3-4). This result confirms an additional augmentation of damages under conditions of high hematocrit apparently related to destabilisation of intracellular structural components of membrane. Modification of interactions between cytoskeletal proteins



**Рис. 1.** Повреждение эритроцитов при замораживании в изоосмотических сахарозо-солевых средах (см. “Материалы и методы”) с различным гематокритом (1 – 0,8%; 2 – 40%).

**Fig. 1.** Erythrocyte damage at freezing in isoosmotic sucrose-saline media (see “Materials and methods”) with different hematocrit values (1 – 0.8%; 2 – 40%).

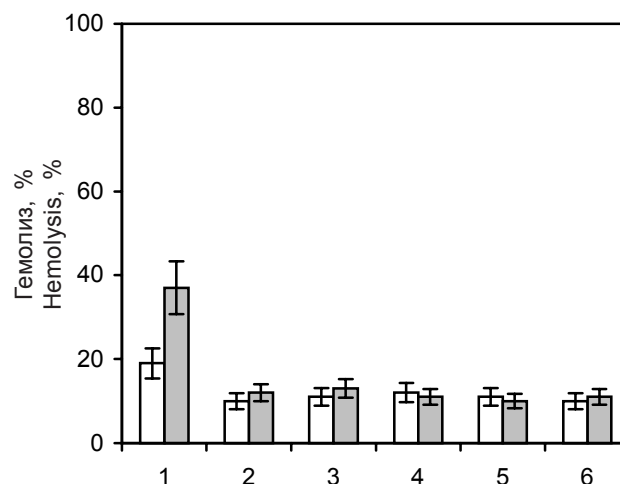
и количества льда, который дополнительно образуется при замораживании с высоким гематокритом [12, 16]. Следует учитывать влияние осмотического воздействия сахарозы на эффект концентрации клеток при замораживании [13]. Присутствие в среде замораживания полимерных или проникающих криопротекторов приводит к снижению степени повреждения клеток при замораживании. Однако для проникающих криопротекторов уже не выявляется существенной разницы между уровнями гемолиза эритроцитов при их замораживании с низким и высоким гематокритом (рис. 2). Кроме того, проникающие криопротекторы устраняют отрицательное влияние высокой концентрации клеток в средах с полимерами (рис. 3, 4). Такой результат указывает на то, что дополнительное увеличение повреждений в условиях высокого гематокрита, видимо, связано с дестабилизацией внутриклеточных структурных составляющих мембраны. Было показано, что модификация взаимодействий между белками цитоскелета или цитоскелетом и мембраной значительно повышает чувствительность эритроцитов к ресуспендированию после замораживания [4]. Развития дополнительных повреждений при замораживании с высоким гематокритом можно избежать при стабилизации клеток мембранными реагентами или повышении концентрации глицерина до 40% [20]. Исследуя процесс замораживания дифференциальной сканирующей калориметрией, установили, что присутствие мембранотропных реагентов не уменьшает



**Рис. 2.** Влияние различных криопротекторов (концентрация 5%) при замораживании эритроцитов с различным гематокритом (□ – 0,8%; ■ – 40%) в среде 2: 1 – контроль; 2 – ПЭГ-1500; 3 – ПЭГ-2000; 4 – Декс-10; 5 – Декс-35; 6 – глюкоза; 7 – ПЭГ-400; 8 – 1,2-ПД; 9 – ДМСО; 10 – глицерин.

**Fig. 2.** Influence of cryoprotectants (concentration of 5%) at freezing erythrocytes with different hematocrit values (□ – 0.8%; ■ – 40%) in medium 2: 1 – control; 2 – PEG-1500; 3 – PEG-2000; 4 – Dex-10; 5 – Dex-35; 6 – glucose; 7 – PEG-400; 8 – 1,2-PD; 9 – DMSO; 10 – glycerol.

or between cytoskeleton and membrane was shown to significantly increase the erythrocyte sensitivity to post-thaw resuspension [4]. Development of additional damages at freezing with high hematocrit can be avoided during cell stabilising with membrane reagents or augmenting glycerol concentration up to 40% [20]. When studying freezing process using differential



**Рис. 3.** Влияние проникающих криопротекторов (концентрация 5%) при замораживании эритроцитов с различным гематокритом (□ – 0,8%; ■ – 40%) в среде-2 с ПЭГ-2000: 1 – контроль; 2 – глюкоза; 3 – ПЭГ-400; 4 – 1,2-ПД; 5 – ДМСО; 6 – глицерин.

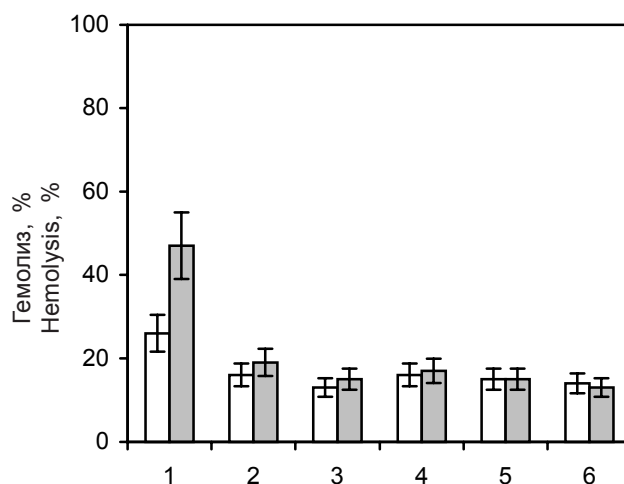
**Fig. 3.** Influence of penetrative cryoprotectants (concentration of 5%) at freezing erythrocytes with different hematocrit values (□ – 0.8%; ■ – 40%) in medium-2 with PEG-2000: 1 – control; 2 – glucose; 3 – PEG-400; 4 – 1,2-PD; 5 – DMSO; 6 – glycerol.



энтальпию образования льда, характерную при повышении концентрации глицерина. Из этого заключили, что защитный эффект мембранотропных реагентов при замораживании с высоким гематокритом не связан с изменениями количества льда, а обусловлен непосредственным действием реагентов на мембрану [20]. Показано, что при комбинации полимерных и проникающих криопротекторов наблюдается положительный эффект в отношении сохранности при замораживании эритроцитов [1, 2], гепатоцитов [3], гранулоцитов [6, 10] и нефракционированных клеток костного мозга [18, 19]. При добавке полимеров существенно снижается концентрация проникающих криопротекторов без изменения структурно-функциональных показателей клеток после замораживания-оттаивания [1-3, 6, 19], что свидетельствует о большей криопротекторной эффективности комбинированных консервантов. В указанных работах не обсуждались причины удовлетворительной сохранности клеток, однако полученные результаты (см. рис. 2-4) свидетельствуют о том, что комбинированная защита приводит к блокированию развития дополнительных повреждений клеточной мембраны при замораживании, которые определяются высокой концентрацией клеток. Учитывая невысокие концентрации проникающих криопротекторов в сочетании с полимерами (см. рис. 3, 4) и описанную выше способность мембранотропных реагентов снимать эффект концентрации клеток [20], можно предположить, что блокирование отрицательного эффекта высокой концентрации клеток связано с непосредственным взаимодействием компонентов комбинированных сред с различными структурами клеточной мембраны.

Повышение концентрации NaCl до 0,15 М приводит к усилению гемолиза при замораживании с устранением эффекта высокой концентрации клеток. Дополнительное увеличение количества полимеров в среде замораживания вызывает снижение степени повреждения эритроцитов с выявлением эффекта “упаковки” (рис. 5). Таким образом, эффект концентрации клеток зависит от количества NaCl или полимера в среде замораживания. В средах с высоким гематокритом внутриклеточная вода существенно влияет на образование внеклеточного льда [12]. При быстром размораживании в условиях высокого гематокрита плавление льда приведет к более интенсивному разведению внешней среды [9]. Это указывает на то, что будет происходить дополнительный прирост постгипертоического воздействия.

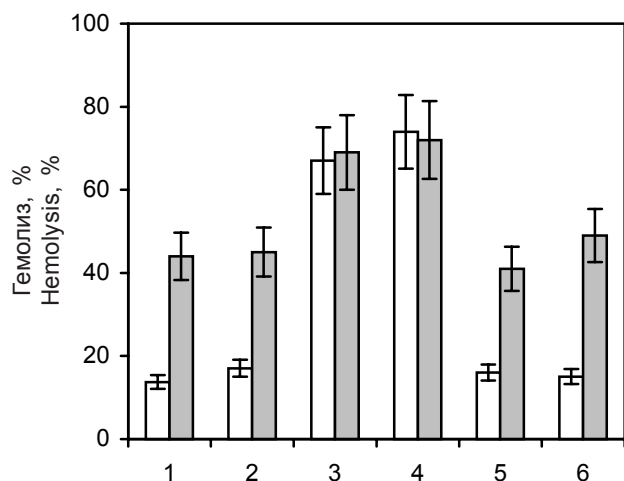
При замораживании клеток в среде с высокой концентрацией NaCl наблюдается практически полный лизис для суспензий с низким гематокритом, однако в случае высокого гематокрита существенная часть клеток (до 30%) не гемолизует (рис. 6).



**Рис. 4.** Влияние проникающих криопротекторов (концентрация 5%) при замораживании эритроцитов с различным гематокритом (□ – 0,8%; ■ – 40%) в среде-2 с Декс-10 (10%): 1 – контроль; 2 – глюкоза; 3 – ПЭГ-400; 4 – 1,2-ПД; 5 – ДМСО; 6 – глицерин.

**Fig. 4.** Influence of penetrative cryoprotectants (concentration of 5%) at freezing erythrocytes with different hematocrit values (□ – 0.8%; ■ – 40%) in medium 2 with Dex-10 (10%): 1 – control; 2 – glucose; 3 – PEG-400; 4 – 1,2-PD; 5 – DMSO; 6 – glycerol.

scanning calorimetry the presence of membrane-tropic reagents was established as not reducing the enthalpy of ice formation, being typical at glycerol concentration increase. It was proceeded that a protective effect of membrane-tropic reagents during freezing with high hematocrit was not related to changes in ice number,



**Рис. 5.** Влияние концентрации NaCl и полимеров при замораживании эритроцитов с различным гематокритом (□ – 0,8%; ■ – 40%) в растворах: 1 – среда-2 + ПЭГ-2000 (концентрация 5%); 2 – среда-2 + Декс-10 (10%); 3 – среда-1 + ПЭГ-2000 (5%); 4 – среда-1 + Декс-10 (10%); 5 – среда-1 + ПЭГ-2000 (10%); 6 – среда-1 + Декс-10 (15%).

**Fig. 5.** Influence of NaCl concentration and polymers at freezing erythrocytes with different hematocrit values (□ – 0.8%; ■ – 40%) in solutions: 1 – medium-2 + PEG-2000 (concentration of 5%); 2 – Dex-10 (10%); 3 – medium-1 + PEG-2000 (5%); 4 – medium-1 + Dex-10 (10%); 5 – medium-1 + PEG-2000 (10%); 6 – medium-1 + Dex-10 (15%).

Такой результат, вероятно, связан с тем, что при низком гематокрите клетки подвергаются большому градиенту концентрации солей при замораживании, тогда как при высоком гематокрите дегидратация клеток еще до замораживания приведет к уменьшению концентрации растворенных веществ во внешней среде, а также снижению постгипертонического воздействия, так как предварительная дегидратация сужает диапазон изменения объема клетки в цикле замораживания-размораживания.

Установлено, что отрицательное влияние повышенного гематокрита на сохранность зависит от скоростей замораживания и размораживания. При сбалансированных скоростях наблюдается минимальное количество повреждений эритроцитов, и значительной разницы между сохранностью клеток после замораживания с низким и высоким гематокритом не выявляется [17].

При высоком гематокрите, когда клетки занимают значительную часть объема среды замораживания, промерзающие каналы включают в себя больше клеток и поэтому эритроциты более подвержены механическому разрушению кристаллами льда в условиях включения внутриклеточной воды во внеклеточный лёд [12]. Вероятность внутриклеточного замерзания будет увеличиваться в суспензии с высоким гематокритом, так как в плотной суспензии клеток относительный размер внеклеточного пространства уменьшается [16]. К тому же агрегация клеток в промерзающих каналах вызывает торможение дегидратации, что приводит к повышению температуры внутриклеточного замерзания [8]. При размораживании суспензий с высоким гематокритом клетки в различных областях будут подвергаться гипертоническому или гипотоническому воздействию [16]. На конечной стадии быстрого размораживания клетки могут испытывать кратковременный гипотонический шок [9], что дополнительно вносит вклад в общее постгипертоническое повреждение.

Таким образом, отрицательное влияние повышения гематокрита в среде замораживания на сохранность клеток можно объяснить дополнительным приростом эффектов концентрирования раствора и льда во вне- и внутриклеточной среде.

Чем может определяться эффект концентрации клеток в средах с NaCl-сахароза или с NaCl-полимер (см. рис. 1, 5) при быстром замораживании и размораживании? В данных условиях время действия высококонцентрированных растворов солей ограничено, а в замороженном состоянии эритроциты дисперсно распределены внутри кристаллов льда, поэтому в момент замораживания не подвергаются действию эффектов плотных межклеточных контактов [14]. В условиях высокой

but stipulated by a direct action of reagents on membrane [20]. Combination of polymer and penetrative cryoprotectants was shown as causing a positive effect in respect to integrity when freezing erythrocytes [1, 2], hepatocytes [3], granulocytes [6, 10] and non-fractionated bone marrow cells [18, 19]. There is a considerable decrease in concentration of penetrative cryoprotectants at addition of polymers, as a result the structural and functional cell indices remain unchanged after freezing [1, 3, 6, 19]. This testifies to higher cryoprotective efficiency of combined preservatives. The causes of satisfactory cell integrity were not discussed in the mentioned works, but the results obtained (see Fig. 2-4) testified to the fact, that a combined protection resulted in blocking development of additional damages in cell membrane at freezing, determined by a high cell density. Taking into consideration low concentrations of penetrative cryoprotectants in combination with polymers (see Fig. 3, 4) and described above capability of membrane-tropic reagents to eliminate the effect of cell density [20], we can assume that blocking of negative effect of cell high density is related to a direct interaction of components of combined media with various structures of cell membrane.

Increase in NaCl concentration up to 0.15 M results in hemolysis strengthening during freezing with eliminating cell high concentration effect. Additional augmentation of polymer amount in freezing medium causes a decrease in erythrocyte damage degree with "packing effect" revealing (Fig. 5). Thus, cell density effect depends on NaCl or polymer amount in freezing medium. In media with high hematocrit an intracellular water significantly affects the extracellular ice formation [12]. At rapid freeze-thawing under high hematocrit the ice melting will result in more intensive dilution of outer medium [9]. This points to the fact, that an additional growth of post-hypertonic effect will occur.

Quite a complete lysis for suspensions with low hematocrit is observed at cell freezing in the media with high NaCl concentration, but in case of a high hematocrit a considerable part of cells (upto 30%) does not hemolyze (Fig. 6).

This result is probably related to the fact that at low hematocrit cells are subjected to greater salt concentration gradient at freezing, meanwhile at high hematocrit even prior to freezing cell dehydration will result in a decrease in dissolved substance concentration in outer medium and some reduction of post-hypertonic effect, because the initial dehydration constricts the limits of change in cell volume in freeze-thawing cycle.

Negative effect of increased hematocrit on the integrity was established to be dependent on freeze-thawing rates. A minimum amount of erythrocyte

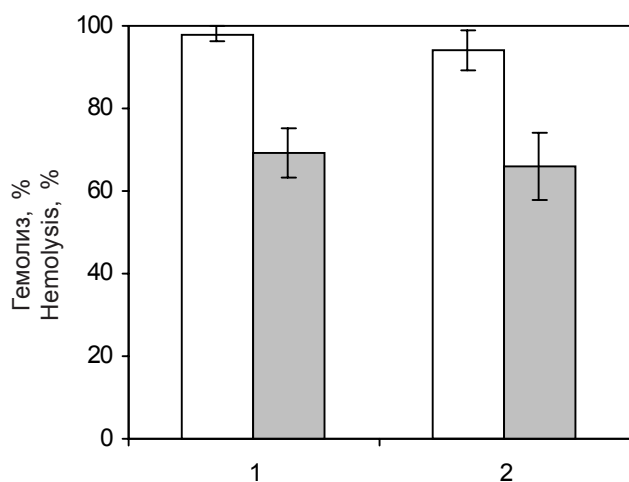
концентрации клеток включение внутриклеточной воды во внеклеточный лед будет большим по сравнению с низким гематокритом, поэтому при быстром размораживании возможны более интенсивное разведение внешней среды и гипотонический шок [9]. При использовании невысоких концентраций полимеров или проникающих криопротекторов (см. рис. 2) не произойдет значительной дегидратации клеток. Присутствие полимеров в среде замораживания не снимает отрицательного эффекта высокого гематокрита на сохранность, в то же время проникающие криопротекторы блокируют его (см. рис. 2). Можно предположить, что причиной этого является не замещение части воды в клетках с проникающими криопротекторами, а стабилизация мембраны совместным действием проникающего и непроникающего криопротекторов к дополнительному приросту постгипертонического воздействия. Было отмечено, что подобная стабилизация мембранотропными реагентами снимает отрицательный эффект плотности клеток при замораживании [20]. В модельных экспериментах показано, что снижение концентрации NaCl в промерзающих каналах приводит к повышению сохранности клеток, замороженных с низким гематокритом в большей степени, чем с высоким, а постгипертонический лизис менее выражен при замораживании высокогематокритных суспензий в условиях изначальной дегидратации [11]. Не исключено, что менее выраженное влияние концентрации солей в плотных суспензиях клеток связано с эффектом разведения внешней среды внутриклеточной водой. Дегид-

damages is observed at balanced rates, where no significant difference between cell integrity after freezing with low and high hematocrit is revealed [17].

At high hematocrit when cells occupy a significant part of freezing medium volume, the frozen channels comprise more cells and therefore erythrocytes are much more subjected to mechanical destruction by ice crystals under conditions of intracellular water inclusion into extracellular ice [12]. The probability of intracellular freezing will augment in suspension with a high hematocrit because in dense cell suspension a relative size of extracellular space reduces [16]. In addition, cell aggregation in frozen channels causes a dehydration inhibition, resulting in temperature increase of intracellular freezing [8]. When freeze-thawing the suspension with high hematocrit cells in different ranges will undergo hypertonic or hypotonic effect [16]. Cells can undergo a short-term hypotonic shock at a final stage of rapid freeze-thawing [19], that additionally contributes to total post-hypertonic damaging.

Thus, a negative effect of hematocrit increase in freezing medium on cell integrity can be explained by additional growth of concentration effects of solution and ice in extra- and intracellular media.

What can determine the effect of cell density in media with NaCl-sucrose or NaCl-polymer (see Fig. 1, 5) during rapid freezing and thawing? Under these conditions the effect time of salt hyperconcentrative solutions is limited, but in a frozen state erythrocytes are dispersially distributed inside ice crystals, therefore in the moment of freezing they are not affected by tight cell-cell contacts [14]. Under conditions of high cell concentration the inclusion of intracellular water into extracellular ice would be higher if to compare with low hematocrit, therefore at freeze-thawing more intensive dilution of outer medium and even hypotonic shock are possible [9]. When using polymers or penetrative cryoprotectants in low concentrations (see Fig. 2) no significant cell dehydration occurs. Polymer presence in freezing medium does not eliminate a negative effect of high hematocrit on the integrity, while the penetrative cryoprotectants block it (see Fig. 2). We can assume that the reason is not in substitution of a part of water in cells with penetrative cryoprotectant, but in membrane stabilisation internally to additional growth of post-hypertonic effect. Similar stabilisation with membrane-tropic reagents was noted to eliminate a negative effect of cell density during freezing [20]. In the model experiments the reduction of NaCl concentration in frozen channel has been demonstrated as resulted in a greater augmentation of cell integrity, being frozen with low hematocrit, than with a high one, but a post-hypertonic lysis is less manifested during freezing of high-hematocrit suspensions under conditions of initial dehydration [11]. Less manifested influence of salt concentration in dense cell suspen-



**Рис.6.** Степень повреждения эритроцитов с различным гематокритом (□ – 0,8%; ■ – 40%) при замораживании в среде 3, содержащей: 1 – ПЭГ-2000(концентрация 5%); 2–Декс-10 (10%).

**Fig. 6.** Damage rate of erythrocytes with different hematocrit values (□ – 0.8%; ■ – 40%) at freezing in medium-3, containing: 1 – PEG-2000 (concentration of 5%), 2 – Dex-10 (10%): (□ – 0.8%; ■ – 40%).

ратация перед замораживанием, которая исключает значительные изменения объёма клеток в цикле криоконсервирования [11], может вызывать существенное снижение уровня повреждения эритроцитов в высокогематокритной суспензии (см. рис. 6). Уменьшение влияния фактора постгипертонического повреждения при замораживании высокогематокритной суспензии в условиях предварительной дегидратации высокими концентрациями NaCl в криозащитной среде объясняется значительным уменьшением диапазона изменения объёма клетки в цикле замораживания-размораживания. Таким образом, предварительная дегидратация клеток высокими концентрациями NaCl в криозащитной среде изменяет степень солевого повреждения при замораживании концентрированной суспензии клеток. По-видимому, дегидратация вызывает разведение соли во внешней среде. Подобная ситуация имеет место в представленных результатах на рис. 5 и 6.

В условиях предварительной дегидратации перед замораживанием наоборот наблюдается положительное влияние повышения концентрации клеток на их сохранность (см. рис. 6). Исходя из этого, можно предположить, что отрицательное влияние повышения гематокрита на сохранность связано с дегидратацией и регидратацией в цикле быстрого замораживания-оттаивания. Сужение диапазона циклического изменения объёма клетки за счёт предварительной дегидратации вызывает изменение направленности влияния высокой концентрации клеток (см. рис. 5, 6), следовательно, отрицательный эффект высокой концентрации определяется усилением постгипертонического стресса при размораживании.

## Выводы

Использование сочетания сахарозы и проникающих криопротекторов в консервирующей среде устраняет отрицательный эффект высокой концентрации клеток за счёт блокирования осмотических механизмов повреждения мембран и, тем самым защищает их от дополнительного постгипертонического воздействия в условиях размораживания.

Использование комбинированных сред при сочетании традиционных криопротекторов (глицерин, ДМСО, 1,2-ПД) с синтетическими полимерами является наиболее перспективным подходом при консервировании самых различных клеток.

## Литература

1. Межидов С.Х., Беляева И.М., Воротилин А.М., Моисеев В.А. Влияние сочетания поливинилпирролидона и 1,2-пропандиола на сохранность эритроцитов при криоконсервировании // Пробл. криобиологии. – 1996. – №2. – С. 22-25.

sions is not excluded to be associated with the effect of extracellular dilution with intracellular water. Dehydration before freezing, excluding significant changes in cell volume during cryopreservation [11], causes considerable reduction of erythrocyte damage level in high-hematocrit suspension (see Fig. 6). A decrease in the factor of post-hypertonic damage at freezing with high-hematocrit suspension under conditions of initial dehydration with high NaCl concentrations in cryoprotective medium is explained by a decrease in ratio of extracellular medium to that of intracellular medium and a significant reduction of cell volume change limits at freeze-thawing [11]. Thus, the preliminary cell dehydration with high NaCl concentrations in cryoprotective medium changes the extent of salt damage during concentrated cell suspension freezing. The same occurs in the results presented in Fig. 5 and 6.

An opposite positive effect of increase in cell concentration on their preservation is observed under preliminary dehydration before freezing (see Fig. 6). Basing on this we can assume that a negative influence of hematocrit increase on integrity is related to dehydration and rehydration during rapid freeze-thawing. Constriction of range of cyclical change of cell volume due to preliminary dehydration causes a change in effect direction of high cell concentration (see Fig. 5, 6), consequently a negative effect of high concentration is determined by strengthening of post-hypertonic stress during freeze-thawing.

## Conclusions

The usage of combination of sucrose and penetrative cryoprotectants in preservation medium eliminates negative effect of cell high concentration because of the blocking of osmotic mechanisms of membrane damage and thereby protecting them against additional post-hypertonic effect under freeze-thawing conditions.

The usage of composite media, when combining traditional cryoprotectants (glycerol, DMSO, 1,2-PD) with synthetic polymers is the most perspective approach to preserve different cells.

## References

1. Mezhdov S.Kh., Belyaeva I.M., Vorotilin A.M., Moiseyev V.A. Effect of a combination of polyvinyl pyrrolidone and 1,2-propanediol on the survival of RBC during cryopreservation // Problems of Cryobiology. – 1996. – N2. – P. 22-25.
2. Mezhdov S.Kh., Moiseyev V.A. Effect of combined treatment by highly molecular cryoprotectants and 1,2-propanediol on survival of red blood cells during cryopreservation // Problems of Cryobiology. – 1995. – N3. – P. 46-48.
3. Petrenko Yu.A. Cryopreservation of human embryonic liver cells using DMSO and high molecular weight polymers // Problems of Cryobiology. – 2003. – N3. – P. 80-87.
4. Ramazanov V.V., Olejnik O.A., Bondarenko V.A. Cryoprotection of modified erythrocytes with polyethylene glycol and dextran // Problems of Cryobiology. – 2005. – N4. – P.622-629.



2. *Межидов С.Х., Моисеев В.А.* Влияние сочетания высокомолекулярных криопротекторов с 1,2-пропандиолом на сохранность эритроцитов при криоконсервировании // Пробл. криобиологии.– 1995.– №3.– С.46-48.
3. *Петренко Ю.А.* Криоконсервирование клеток эмбриональной печени человека с использованием ДМСО и высокомолекулярных полимеров // Пробл. криобиологии.– 2003.– №3.– С. 80-87.
4. *Рамазанов В.В., Олейник О.А., Бондаренко В.А.* Криопротекция полиэтиленгликолем и декстраном модифицированных эритроцитов // Пробл. криобиологии.– 2005.– №4.– С. 622-629.
5. *Brearley C.A., Hodges N.A., Olliff C.J.* Nonmonotonic trends in electrolyte-induced injury to rapidly cooled erythrocytes // *Cryobiology.*– 1992.– Vol. 29, N2.– P. 175-182.
6. *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. 97-102.
7. *Dalgliesh R.J.* Effect of an interaction between haematocrit and cryoprotectant concentration on freeze-thaw haemolysis of bovine erythrocytes // *Cryobiology.*– 1976.– Vol. 13, N2.– P. 254-257.
8. *Levin R.L., Cravalho E.G., Huggins C.E.* Water transport in a cluster of closely packed erythrocytes at subzero temperatures // *Cryobiology.*– 1977.– Vol. 14, N5.– P. 549-558.
9. *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, N 6.– P. 669.
10. *Lionetti F.J., Hunt S.M., Gore J.M., Curby W.A.* Cryopreservation of human granulocytes // *Cryobiology.*– 1975.– Vol. 12, N3.– P. 181-191.
11. *Mazur P., Cole K.W.* Roles of unfrozen fraction, salt concentration, and changes in cell volume in the survival of frozen human erythrocytes // *Cryobiology.*– 1989.– Vol. 26, N1.– P. 1-29.
12. *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.
13. *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.
14. *Nei T.* Effect of initial of cell concentration of the post-thaw hemolysis of frozen erythrocytes // *Cryobiology.*– 1976.– Vol. 13, N6.– P. 651.
15. *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.
16. *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.
17. *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.
18. *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.
19. *Stiff P.J., Murgo 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.
20. *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.
5. *Brearley C.A., Hodges N.A., Olliff C.J.* Nonmonotonic trends in electrolyte-induced injury to rapidly cooled erythrocytes // *Cryobiology.*– 1992.– Vol. 29.– N2.– P. 175-182.
6. *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. 97-102.
7. *Dalgliesh R.J.* Effect of an interaction between haematocrit and cryoprotectant concentration on freeze-thaw haemolysis of bovine erythrocytes // *Cryobiology.*– 1976.– Vol. 13, N2.– P. 254-257.
8. *Levin R.L., Cravalho E.G., Huggins C.E.* Water transport in a cluster of closely packed erythrocytes at subzero temperatures // *Cryobiology.*– 1977.– Vol. 14, N5.– P. 549-558.
9. *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, N 6.– P. 669.
10. *Lionetti F.J., Hunt S.M., Gore J.M., Curby W.A.* Cryopreservation of human granulocytes // *Cryobiology.*– 1975.– Vol. 12, N3.– P. 181-191.
11. *Mazur P., Cole K.W.* Roles of unfrozen fraction, salt concentration, and changes in cell volume in the survival of frozen human erythrocytes // *Cryobiology.*– 1989.– Vol. 26, N1.– P. 1-29.
12. *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.
13. *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.
14. *Nei T.* Effect of initial of cell concentration of the post-thaw hemolysis of frozen erythrocytes // *Cryobiology.*– 1976.– Vol. 13, N6.– P. 651.
15. *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.
16. *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.
17. *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.
18. *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.
19. *Stiff P.J., Murgo 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.
20. *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.

*Accepted in 01.03.22005*

*Поступила 01.03.2005*