

УДК 547.426.1:612.111:615.014.41

Ю.С. Пахомова*, А.М. Компаниец, Л.Г. Кулешова

Трансформация эритроцитов на этапах криоконсервирования в криозащитных средах на основе оксиэтилированных производных глицерина со степенью полимеризации $n = 25$ и $n = 30$

UDC 547.426.1:612.111:615.014.41

Yu.S. Pakhomova*, A.M. Kompaniets, L.G. Kuleshova

Transformation of Erythrocytes During Cryopreservation with Oxyethylated Glycerol Derivatives with $n = 25$ and $n = 30$ Polymerization Degree

Реферат: В работе представлены экспериментальные данные относительно влияния оксиэтилированных производных глицерина со степенью полимеризации $n = 25$ и $n = 30$ (ОЭГ _{$n=25$} и ОЭГ _{$n=30$}) на форму и диаметр эритроцитов человека на этапах криоконсервирования. Форму и диаметр клеток до и после криоконсервирования изучали в «живой капле» методом иммерсионной микроскопии. Показано, что контакт с исследованными криозащитными растворами и дальнейшее низкотемпературное консервирование приводят к трансформации эритроцитов. Характер изменения их формы и диаметра до и после криоконсервирования зависит от степени полимеризации и концентрации криопротектора. Установлено, что 40%-е растворы ОЭГ _{$n=25$} и ОЭГ _{$n=30$} на этапе экспозиции вызывают деформацию и агглютинацию клеток. Наибольшее количество эритроцитов дискоидной формы сохранялось после криоконсервирования в 30%-х растворах ОЭГ _{$n=25$} и ОЭГ _{$n=30$} . Установлено, что после охлаждения-отогрева клеток в 30%-м растворе ОЭГ _{$n=30$} увеличился их диаметр, а при использовании 30%-й концентрации ОЭГ _{$n=25$} данный параметр находился в пределах нормы.

Ключевые слова: оксиэтилированные производные глицерина, эритроциты, форма, диаметр, криоконсервирование.

Реферат: У роботі подано експериментальні дані щодо впливу оксиетильованих похідних гліцерину зі ступенем полімеризації $n = 25$ і $n = 30$ (ОЕГ _{$n=25$} і ОЕГ _{$n=30$}) на форму та діаметр еритроцитів людини на етапах криоконсервування. Форму та діаметр клітин до та після криоконсервування вивчали в «живій краплині» методом імерсійної мікроскопії. Показано, що контакт із дослідженими криозахисними розчинами та подальше низькотемпературне консервування призводять до трансформації еритроцитів. Характер зміни їх форми та діаметра до та після криоконсервування залежить від концентрації та ступеня полімеризації криопротектора. Встановлено, що розчини ОЕГ _{$n=25$} і ОЕГ _{$n=30$} у концентрації 40% на етапі експозиції викликають деформацію і аглютинацію клітин. Найбільша кількість еритроцитів дискоїдної форми зберігалася після криоконсервування в 30%-х розчинах ОЕГ _{$n=25$} і ОЕГ _{$n=30$} . Встановлено, що після охолодження-відігрівання клітин в 30%-му розчині ОЕГ _{$n=30$} збільшився їх діаметр, а при використанні 30%-ї концентрації ОЕГ _{$n=25$} даний параметр знаходився в межах норми.

Ключові слова: оксиетильовані похідні гліцерину, еритроцити, форма, діаметр, криоконсервування.

Abstract: This paper presents experimental data on the effect of oxyethylated glycerol derivatives with $n = 25$ and $n = 30$ polymerization degree (OEG _{$n=25$} and OEG _{$n=30$}) on shape and diameter of human erythrocytes at the stages of cryopreservation. The shape and diameter of the cells before and after cryopreservation were studied in 'live drop' by means of immersion microscopy. It has been shown that the contact with the investigated cryoprotective solutions and following low temperature preservation led to erythrocyte transformation. Character of change in their shape and diameter before and after cryopreservation depended upon the polymerization degree and concentration of cryoprotectant. It was established that 40% OEG _{$n=25$} and OEG _{$n=30$} solutions at the exposure stage caused cell deformation and agglutination. The largest number of erythrocytes of discoid shape was maintained after cryopreservation in 30% OEG _{$n=25$} and OEG _{$n=30$} solutions. It was found that after cooling-warming the cells in 30% OEG _{$n=30$} solution their diameter increased, while using 30% concentration of OEG _{$n=25$} this parameter was within the normal range.

Key words: oxyethylated glycerol, erythrocyte, shape, diameter, cryopreservation.

Применение клеток и препаратов крови – перспективное направление в экспериментальной и клинической трансфузиологии. Использование компонентов и препаратов крови позволяет бороться с такими опасными заболеваниями, как анемия,

The use of blood cells and preparations is of great importance for experimental and clinical transfusion. Using the blood components and products is helpful in treating dangerous diseases such as anemia, thrombocytopenia, sepsis *etc.* [5, 9, 20]. The most valuable

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

Department of Cryoprotectants, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52,
электронная почта: juliypakhomova@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 3737435, fax: +380 57 373 5952,
e-mail: juliypakhomova@gmail.com

Поступила 11.10.2016
Принята в печать 28.10.2016

Received October, 11, 2016
Accepted October, 28, 2016

© 2016 Yu.S. Pakhomova et al., Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

тромбоцитопения, сепсис и др. [5, 18, 25]. Наиболее ценным лечебным качеством крови является ее способность выполнять газотранспортную функцию, которую осуществляют эритроциты. Продолжительность жизни эритроцитов в кровеносном русле человека составляет около 120 суток. Каждые сутки разрушается около 1% циркулирующих в крови эритроцитов, которые замещаются таким же количеством «молодых» клеток, обладающих лучшей способностью к диссоциации кислорода.

Существующие гипотермические способы хранения обеспечивают сохранность эритроцитарных компонентов в течение 5 суток, что ограничивает их рациональное использование. Приоритетное направление в данной области – создание методов долгосрочного хранения эритроцитов человека путем их криоконсервирования при температуре -196°C . Для создания методов, не требующих отмывания клеток перед трансфузией, в качестве непроникающих криопротекторов используют полимерные соединения [3, 13, 24, 27, 28]. В частности, олигомеры оксиэтилированного глицерина (ОЭГ), которые впервые были синтезированы в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков), являются перспективными соединениями для замораживания эритроцитов [11, 14]. Эти вещества относятся к искусственным полимерным соединениям с химической формулой $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3-(\text{--CH}_2\text{--CH}_2\text{--O--})_n\text{H}_3$, где n – степень полимеризации, которая может варьировать в значительных пределах [14].

Ранее было показано [15, 16], что олигомеры ОЭГ со степенями полимеризации $n = 25$ и $n = 30$ обладают высокой защитной активностью при криоконсервировании эритроцитов человека. Результаты токсико-фармакологических исследований на мышах и крысах линии Вистар показали, что при однократном введении в организм ОЭГ _{$n=25$} и ОЭГ _{$n=30$} оказывают незначительное токсическое действие [6, 9]. Вместе с тем морфологические и морфометрические характеристики эритроцитов до и после замораживания-отогрева с ОЭГ изучены недостаточно. Форма и размер эритроцитов – важные характеристики при изучении их сохранности, поскольку изменение этих параметров может привести к утрате клетками способности транспортироваться через микроциркуляторное русло и выполнять свою основную газотранспортную функцию. Оптимальная форма эритроцита для эффективного участия в газообмене – это двояковогнутый диск. Такая форма обеспечивает высокую пластичность, благодаря которой эритроцит диаметром в 7,5 мкм способен проникать через капилляры в 2 мкм [17].

При воздействии различных факторов и химических соединений трансформация клеток проис-

therapeutic feature of blood is its ability to perform gas-transport function, accomplished by erythrocytes. The lifespan of erythrocytes in human bloodstream makes about 120 days. Each 24 hrs about 1% of erythrocytes circulating in blood are destroyed, and replaced by the same number of ‘young’ cells capable of better oxygen dissociation.

Existing methods of hypothermic storage allow to preserve erythrocyte components for 45 days, that restricts their efficient use. Designing the methods of long-term storage of human erythrocytes by means of their cryopreservation at -196°C is the priority in this area. To create the methods not requiring the washing of the cells before transfusion, the polymer compound are used as non-penetrating cryoprotectants [3, 7, 19, 23–25]. In particular, these are oligomers of oxyethylated glycerol (OEG), being for the first time synthesized at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine (Kharkiv) which are also promising compounds for freezing red blood cells [6, 16]. These substances are artificial polymeric compounds with the chemical formula $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3-(\text{--CH}_2\text{--CH}_2\text{--O--})_n\text{H}_3$ where n is the polymerization degree, which can vary widely [16].

It has previously been shown [10, 18], that OEG oligomers with polymerization degrees $n = 25$ and $n = 30$ have a high protective activity during cryopreservation of human erythrocytes. The results of toxicological and pharmacological studies in mice and Wistar rats showed that a single introduction of OEG _{$n=25$} and OEG _{$n=30$} into animals had insignificant toxic effect [14, 24]. However, morphological and morphometric parameters of erythrocytes prior to and after freezethawing with OEG have been poorly studied. The shape and size of red blood cells are the most important characteristics in investigating their integrity, since the change in these parameters can lead to the loss of the ability of cells to be transported through the microcirculation system and to perform its primary function of gas transport. The optimum shape of erythrocyte to effectively participate in gas exchange is a biconcave disc. This shape provides high flexibility, whereby the erythrocyte of 7.5 microns diameter can penetrate through the 2 microns capillaries [26].

Under the influence of various factors and chemical compounds the transformation of cells is accompanied with an increase in their dispersion and shifts in intracellular hemoglobin content [16]. There are two types of erythrocyte transformation, reversible and irreversible. For example, a reversible transformation of erythrocytes in bloodstream can reduce the affinity of hemoglobin for oxygen and irreversible one may change the rheological properties of blood, which in turn is followed by chronic hypercoagulable, endothelial dysfunction, hypoxia, and anoxia follows a complete stasis. In addition, erythrocytes with a strongly altered size and



ходит параллельно с увеличением дисперсии их размеров и сдвигами в содержании внутриклеточного гемоглобина [22]. Существует два типа трансформации эритроцитов – обратимая и необратимая. Так, обратимая трансформация эритроцитов в кровеносном русле может привести к снижению сродства гемоглобина к кислороду, а необратимая – к изменению реологических свойств крови, что, в свою очередь, сопровождается хронической гиперкоагуляцией, эндотелиальной дисфункцией, гипоксией, а при полном стазе – аноксией. Кроме того, эритроциты со значительно измененными размером и формой будут преждевременно утилизированы из кровеносного русла, что может привести к развитию анемии [12].

Важное требование, предъявляемое к непроницающим криопротекторам, – это сохранение морфологической целостности эритроцитов на этапах низкотемпературного консервирования. В этой связи проведение морфологических и морфометрических исследований эритроцитов до и после охлаждения/отогрева в растворах ОЭГ_{n=25} и ОЭГ_{n=30} является актуальной задачей.

Цель работы – изучить форму и размер эритроцитов на этапах криоконсервирования в криозащитных средах на основе оксиэтилированных производных глицерина со степенями полимеризации $n = 25$ и $n = 30$.

Материалы и методы

Материалом для исследований были эритроциты, полученные методом фракционирования цельной донорской крови группы А (II), заготовленной на консерванте «Глюгисир» («Биофарма», Украина) в Харьковском областном центре переливания крови. Цельную донорскую кровь хранили в контейнерах «Гемакон» («Ravimed», Польша) не более 48 ч при температуре $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$. Клетки из донорской крови выделяли методом центрифугирования при 1250g в течение 25 мин с последующим удалением плазмы и лейкоцитарного слоя. В работе использовали эритроконцентрат с гематокритом в среднем 70%.

Для экспериментальных исследований применяли криопротектор – оксиэтилированный глицерин со степенью полимеризации $n = 25$ (м. м. $\sim 1089,31$) и $n = 30$ (м. м. $\sim 1308,70$) («Барва», Украина). Растворы криопротекторов в концентрации 20, 30 и 40% готовили на основе фосфатного буфера (7,1 г Na_2HPO_4 ; 6,1 г NaH_2PO_4 , pH 7,4), содержащего 0,15 М NaCl. Криозащитные растворы применяли после 24 ч выдерживания при комнатной температуре.

К эритроконцентрату на протяжении 5 мин по каплям при температуре $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ добавляли 20, 30 и 40% ОЭГ_{n=25} и ОЭГ_{n=30} в соотношении 1:1 (v/v).

shape will be early scavenged from the bloodstream, that can lead to the development of anemia [18].

An important requirement to non-penetrative cryoprotectants is to preserve the morphological integrity of erythrocytes at the low-temperature preservation stages. In this regard morphological and morphometric investigation of erythrocytes prior to and after the freeze-thawing in the solutions OEG_{n=25} and OEG_{n=30} is a primary task.

The research aim was to study the shape and size of erythrocytes at the stages of cryopreservation in cryoprotective media based on ethoxylated derivatives of glycerol having a $n = 25$ and $n = 30$ polymerization degrees.

Materials and methods

The research object were erythrocytes, obtained by fractionation of whole blood group A (II), procured with Glyugitsir preservative (Biofarma, Ukraine) in the Kharkiv Regional Blood Center. Whole donor blood was stored in blood bags (Ravimed, Poland) not more than 48 hrs at a temperature of $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$. Cells were isolated from donor blood by centrifugation at 1250g for 25 min followed by removal of the plasma and leuko-platelet layer. We used erythroconcentrate with a hematocrit of 70% in average.

For experimental studies we have used oxyethylated glycerol with polymerization degree of $n = 25$ (m. w. $\sim 1,089.31$) and $n = 30$ (m. w. $\sim 1,308.70$) (Barva, Ukraine) as cryoprotectant. Cryoprotectant solutions of 20, 30 and 40% were prepared with phosphate-buffered (7.1 g Na_2HPO_4 ; 6.1 g of NaH_2PO_4 , pH 7.4) containing 0.15 M NaCl. Cryoprotective solutions were applied after a 24 hrs' hold at room temperature.

During 5 min at a temperature of $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ 20, 30 and 40% OEG_{n=25} and OEG_{n=30} solutions (v/v) dropwise added to erythroconcentrate in 1:1 ratio. The duration of erythrocytes exposure with cryoprotective solutions was 15 min. Cell samples were cooled in 1.8 ml cryovials (Nunc, Germany) by a direct immersion into liquid nitrogen (-196°C) for not more than three weeks. Samples were warmed in a water bath ($40...42^\circ\text{C}$) with constant shaking of the container. Erythrocytes being in autologous plasma served as the control.

Erythrocytes were morphologically and morphometrically analyzed in a 'live drop' by the method of immersion microscopy with microscope Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Germany). Images were collected and analysed using AxioVision 4.8 software (Carl Zeiss). The shape of red blood cells was assessed by M. Bessis classification [4].

Statistical analysis of experimental data was performed using Statistica 6.0 software (StatSoft Inc., USA). Qualitative attributes were evaluated by the relative frequency of an attribute or the proportion (P),



Продолжительность экспозиции эритроцитов в криозащитных растворах составляла 15 мин. Образцы клеток охлаждали в криоампулах («Nunc», Германия) объемом 1,8 мл прямым погружением в жидкий азот (-196°C), не более трех недель. Образцы отогревали на водяной бане ($40\text{--}42^{\circ}\text{C}$) при постоянном покачивании контейнера. Контролем служили эритроциты, находящиеся в аутологичной плазме.

Морфологический и морфометрический анализ эритроцитов проводили в «живой капле» методом иммерсионной микроскопии в микроскопе «Axio Vision Z1» («Carl Zeiss», Германия). Фоторегистрацию и анализ изображений выполняли с помощью программного обеспечения «AxioVision 4.8» («Carl Zeiss»). Форму эритроцитов оценивали по классификации М. Bessis [17].

Для статистического анализа экспериментальных данных использовали пакет программ «Statistica 6.0» («StatSoft Inc.», США). Качественные признаки оценивали по относительной частоте признака или доли (P), а также по средней ошибке доли ($P \pm S_p$) ($n = 3$). При проверке нулевой гипотезы о равенстве долей применяли z -критерий. Расхождение между группами считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Эритроциты, находящиеся в аутологичной плазме, представляют собой гетерогенную популяцию, содержащую ($96,60 \pm 0,07\%$) дискоцитов; ($1,01 \pm 0,06\%$) стоматоцитов; ($1,50 \pm 0,04\%$) эхиноцитов; ($0,41 \pm 0,03\%$) сфероцитов и ($0,50 \pm 0,01\%$) сфероэхиноцитов (рис. 1 и 2). После 60 мин экспозиции в растворах криопротекторов ОЭГ _{$n=25$} и ОЭГ _{$n=30$} при температуре (20 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ клетки приобретали форму дискоцитов и стоматоцитов. В 20- и 30%-х растворах ОЭГ _{$n=25$} доля эритроцитов, трансформировавшихся в стоматоциты, была незначительной ($4,70 \pm 0,02$ и $8,1 \pm 0,05$), более 90% клеток имело дискоидную форму. В результате взаимодействия клеток с 20%-м раствором ОЭГ _{$n=30$} доля стоматоцитов по сравнению с контролем увеличилась в 20 раз. При взаимодействии с 30%-м раствором ОЭГ _{$n=30$} более 80% клеток трансформировались в стоматоциты. В 40%-х растворах исследуемых криопротекторов клетки значительно деформировались, поэтому классифицировать их по общепринятому методу не представлялось возможным.

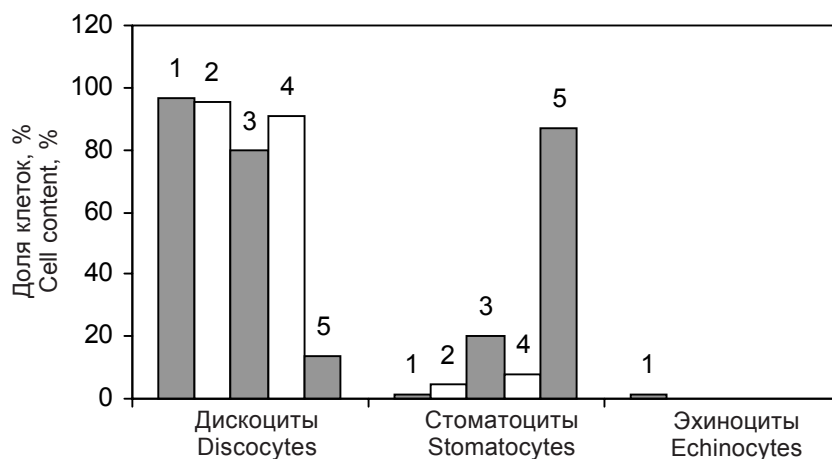


Рис. 1. Количественное содержание морфологических форм эритроцитов в плазме и растворах ОЭГ _{$n=25$} и ОЭГ _{$n=30$} при температуре 20°C ; 1 – аутологичная плазма, 2 – 20% ОЭГ _{$n=25$} , 3 – 20% ОЭГ _{$n=30$} , 4 – 30% ОЭГ _{$n=25$} , 5 – 30% ОЭГ _{$n=25$} .

Fig. 1. Amount of erythrocytes of different morphological forms in plasma and after exposure to OEG _{$n=25$} and OEG _{$n=30$} solutions at temperature 20°C ; 1 – autologous plasma, 2 – 20% OEG _{$n=25$} , 3 – 20% OEG _{$n=30$} , 4 – 30% OEG _{$n=25$} , 5 – 30% OEG _{$n=25$} .

as well as a mean error of proportion ($P \pm S_p$) ($n = 3$). When testing the null hypothesis of the equality of shares the z -test was used. The difference between groups was considered as statistically significant at $p \leq 0.05$.

Results and discussion

Erythrocytes being in autologous plasma were heterogeneous population containing ($96.60 \pm 0.07\%$) discocytes; ($1.01 \pm 0.06\%$) stomatocytes; ($1.50 \pm 0.04\%$) echinocytes; ($0.41\% \pm 0.03$) spherocytes and ($0.50 \pm 0.01\%$) spheroechinocytes (Figs. 1 and 2). After 60 min incubation with the solutions of cryoprotectants OEG _{$n=25$} and OEG _{$n=30$} at (20 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ the cells acquired the shape of discocytes and stomatocytes. In the 20 and 30% OEG _{$n=25$} cryoprotectant solutions the share of erythrocytes transformed into stomatocytes was negligible (4.70 ± 0.02 and 8.1 ± 0.05), more than 90% of the cells had a discoid shape. As a result of interaction of cells with a 20% solution OEG _{$n=30$} the share of stomatocytes increased by 20 times if compared to the control. When interacting with 30% OEG _{$n=30$} solution more than 80% of cells transformed into stomatocytes. In 40% solutions of the studied cryoprotectants the cells were strongly deformed, so it was not possible to classify them according to the traditional method.

The data of microscopic analysis enabled to reveal one more important trend of erythrocyte transformation in presence of oxyethylated derivatives of glycerol. After exposure to a 30% OEG _{$n=30$} solution single clusters of erythrocytes were observed, *i. e.* the cell agglomerates were formed. As Fig. 2 demonstrates, in 40%



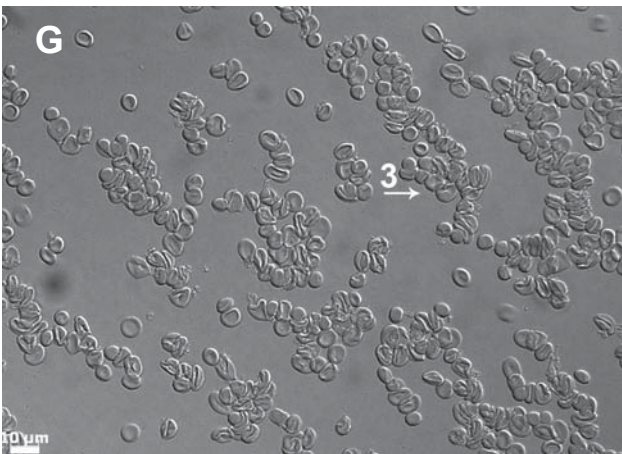
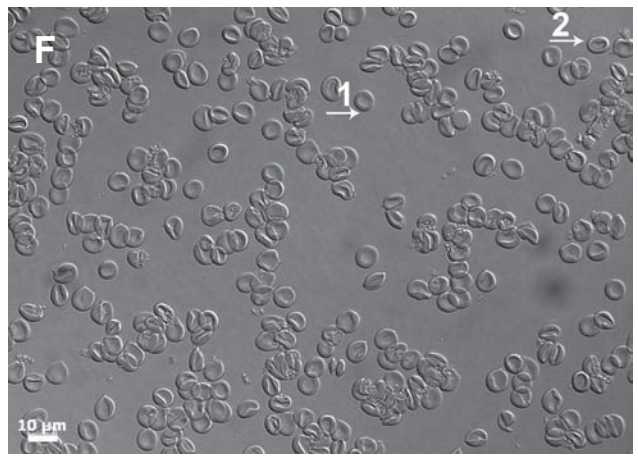
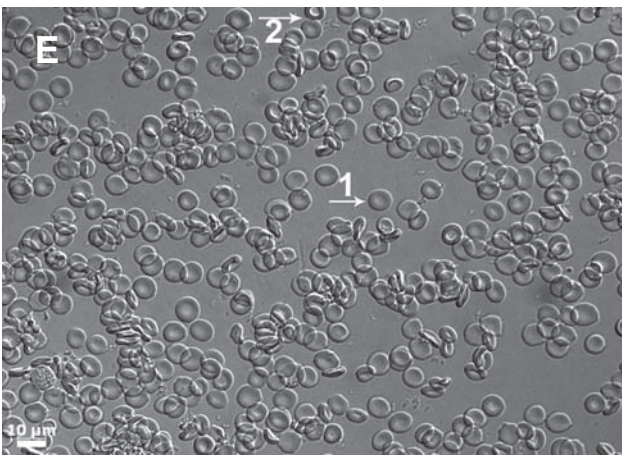
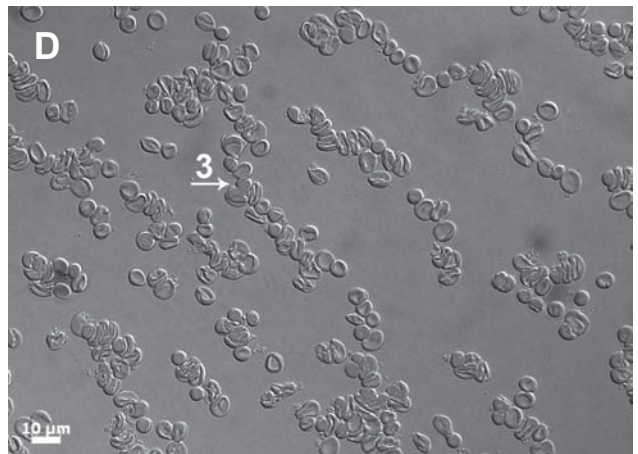
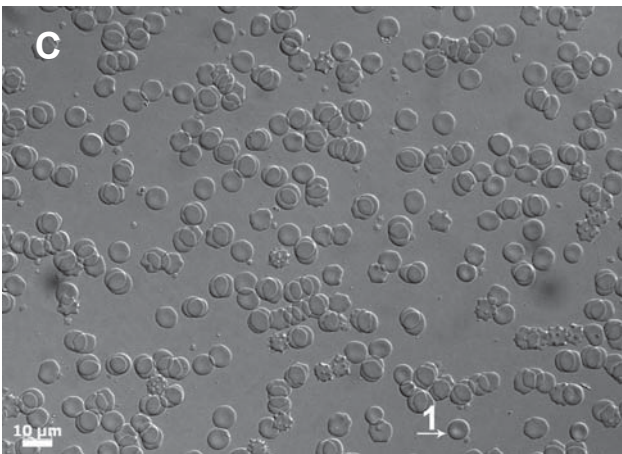
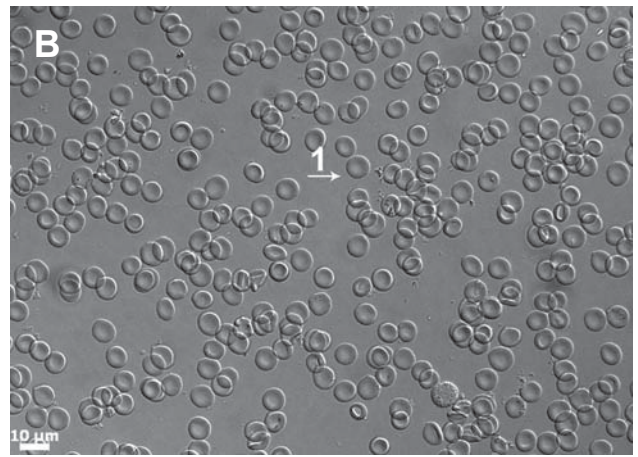
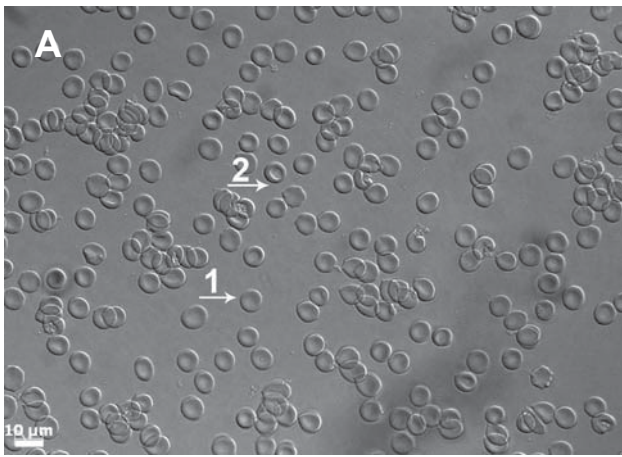


Рис. 2. Эритроциты после экспозиции в растворах ОЭГ_{n=25} и ОЭГ_{n=30} (1 – дискоцит, 2 – стоматоцит, 3 – агломераты клеток); **A** – аутологичная плазма; **B** – 20% ОЭГ_{n=25}; **C** – 30% ОЭГ_{n=25}; **D** – 40% ОЭГ_{n=25}; **E** – 20% ОЭГ_{n=30}; **F** – 30% ОЭГ_{n=30}; **G** – 40% ОЭГ_{n=30}.

Fig. 2. Erythrocytes after exposure in OEG_{n=25} and OEG_{n=30} solutions (1 – discocyte, 2 – stomatocyte, 3 – cell agglomerates); **A** – autologous plasma; **B** – 20% OEG_{n=25}; **C** – 30% OEG_{n=25}; **D** – 40% OEG_{n=25}; **E** – 20% OEG_{n=30}; **F** – 30% OEG_{n=30}; **G** – 40% OEG_{n=30}.

Данные микроскопического анализа позволили выявить другую важную тенденцию трансформации эритроцитов в присутствии оксиэтилированных производных глицерина. После экспозиции в 30%-м растворе ОЭГ_{n=30} были отмечены единичные скопления эритроцитов, т. е. формирование клеточных агломератов. Как видно из рис. 2, в 40%-х растворах данных криопротекторов клетки образовывали крупные скопления, имеющие неупорядоченную структуру, что свидетельствовало об их агглютинации. При этом в 40%-м растворе ОЭГ_{n=30} агглютинация эритроцитов более выражена, чем в растворе ОЭГ_{n=25} с такой же концентрацией.

Для получения информации о линейных размерах эритроцитов после взаимодействия с 20- и 30%-ми растворами криопротекторов ОЭГ_{n=25} и ОЭГ_{n=30} был измерен их диаметр. В 40%-х растворах исследуемых веществ данный параметр не определяли из-за агглютинации клеток. Результаты морфометрического анализа контрольных образцов свидетельствуют, что величина диаметра эритроцитов находится в интервале 6,1–9,0 мкм (рис. 3, А, В, кривая 1). Эритроцитометрическая кривая симметрична, ее пик находится в интервале 7,1–8,0 мкм, что соответствует значению диаметра клеток периферической крови в норме [17]. После 60 мин экспозиции эритроцитов в 20- и 30%-х растворах ОЭГ_{n=25} пики эритроцитометрических кривых находятся в интервале 7,1–8,0 мкм, что соответствует контрольному значению (рис. 3, А, В; кривые 2, 3). При этом наблюдалась тенденция к увеличению диаметра клеток. По сравнению с контролем значимо увеличилась доля эритроцитов с диаметром 8,1–9,0 мкм. Кроме того, наблюдались клетки с диаметром 9,1–10,0 мкм. При этом в 30%-м растворе ОЭГ_{n=25} их доля была больше, чем в 20%-м растворе этого же криопротектора (рис. 3, А; кривая 3). После экспозиции в 20- и 30%-х растворах ОЭГ_{n=30} отмечено значимое увеличение диаметра эритроцитов по сравнению с контролем (рис. 3, В), что подтверждается сдвигом пика эритроцитометрической кривой в диапазон численных значений 8,1–9,0 мкм. При сопоставлении данных эритроцитометрических кривых (рис. 3, А, В; кривые 2 и 3) после взаимодействия эритроцитов с 30%-м раствором ОЭГ_{n=30} была выявлена наибольшая доля клеток с увеличенным диаметром

На следующем этапе работы исследовали сохранность формы и диаметра эритроцитов после цикла охлаждения-отогрева в криозащитных средах на основе непроникающих криопротекторов ОЭГ_{n=25} и ОЭГ_{n=30}. Для этого в отогретых образцах оценивали соотношение различных морфологических форм клеток. Деконсервированная суспензия эритроцитов содержала дискоциты, стоматоциты, эхиноциты,

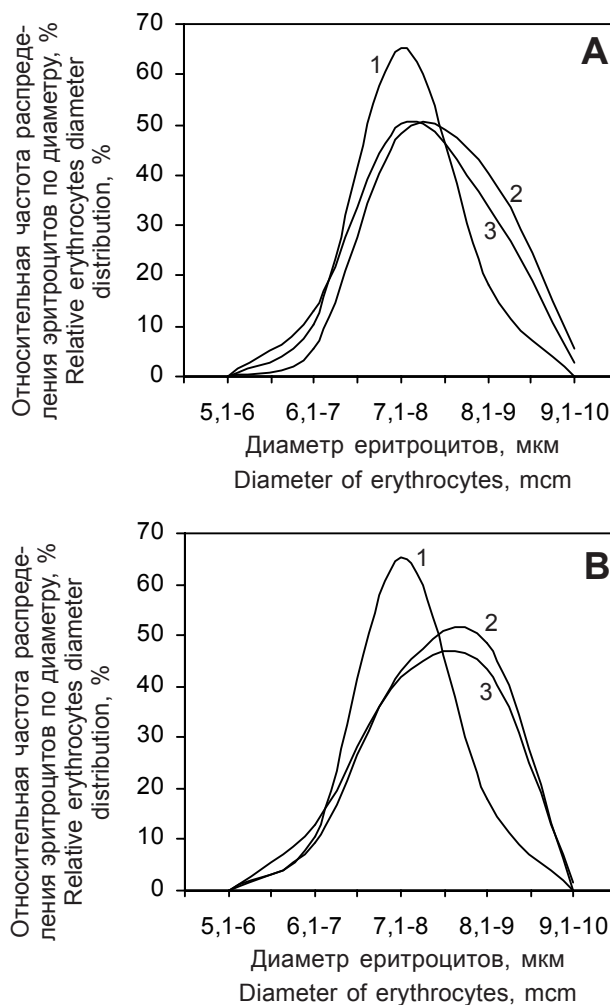


Рис. 3. Диаметр эритроцитов после экспозиции в растворах ОЭГ_{n=25} (А) и ОЭГ_{n=30} (В): 1 – контроль, 2 – 30% ОЭГ_{n=25} и ОЭГ_{n=30}, 3 – 20% ОЭГ_{n=25} и ОЭГ_{n=30}.

Fig. 3. Diameter of erythrocytes after exposure in OEG_{n=25} (A) and OEG_{n=30} (B) solutions: 1 – control, 2 – 30% OEG_{n=25} and OEG_{n=30}, 3 – 20% OEG_{n=25} and OEG_{n=30}.

solutions of these cryoprotectants the cells formed large clusters with a disordered structure, which evidenced to their agglutination. Herewith in a 40% OEG_{n=30} solution an agglutination of erythrocytes was more pronounced than in that of OEG_{n=25} of the same concentration.

To retrieve the information on linear dimensions of erythrocytes after interaction with 20 and 30% OEG_{n=25} and OEG_{n=30} solutions of cryoprotectants their diameter was measured. This was not performed in 40% solutions of the investigated substances because of cell agglutination. The results of morphometric analysis of the control samples showed that the diameter of erythrocytes was within the ranges of 6.1–9.0 mm (Fig. 3A and B, curve 1). Erythrometric curve was symmetrical, its peak was in the range of 7.1–8.0 mm, that corresponded to the diameter of peripheral blood of normal cells [4]. After 60 min long exposure of



сфероэхиноциты, сфероциты и деформированные клетки (рис. 4). После охлаждения-отогрева эритроцитов в 20%-м растворе ОЭГ_{n=25} отмечался выраженный сфероцитоз (более 50% от всей популяции клеток), при этом количество дискоцитов составляло (43,11 ± 0,06)%. Кроме того, в деконсервированной суспензии были выявлены сфероэхиноциты и деформированные клетки (рис. 5, А). Форма эритроцитов, криоконсервированных в 20%-м растворе ОЭГ_{n=30}, после отогрева существенно изменилась. Так, количество дискоцитов в образце составило всего (15,91 ± 0,04)%, а большинство клеток ((60,0 ± 0,07)%) были деформированы и не соответствовали общепринятой классификации [17]. В суспензии выявлено небольшое количество эхиноцитов и сфероцитов (рис. 5, С).

После криоконсервирования эритроцитов с 30%-ми растворами ОЭГ_{n=25} и ОЭГ_{n=30} наблюдалось значительное изменение формы отогретых клеток по сравнению с 20%-ми растворами этих криопротекторов. Доля дискоидных клеток после охлаждения-отогрева в 30%-х растворах ОЭГ_{n=25} и ОЭГ_{n=30} увеличилась и составила (87,50 ± 0,06) и (59,40 ± 0,08)% соответственно (рис. 5, В, D). В образцах значительно уменьшилось количество сфероцитов и деформированных клеток. Так, после криоконсервирования в 30%-м растворе ОЭГ_{n=25} доля сфероцитов снизилась более чем в 3 раза, а в 30%-м растворе ОЭГ_{n=30} доля деформированных клеток уменьшилась в 4,4 раза. При этом в 30%-х растворах ОЭГ_{n=25} и ОЭГ_{n=30} было отмечено появление эритроцитов, имеющих форму стоматоцитов и эхиноцитов.

Эритроцитометрический анализ показал, что после криоконсервирования в 20%-м растворе ОЭГ_{n=25} и 30%-м растворе ОЭГ_{n=30} у отогретых клеток значительно уменьшился диаметр по сравнению с контролем. О данных изменениях свидетельствовали смещение пика распределения в интервал 6,1–7,0 мкм, а также появление клеток с диаметром 5,1–6,0 мкм (рис. 6). Криоконсервирование эритроцитов в 30%-м растворе ОЭГ_{n=25} (рис. 6, А; кривая 3) и 20%-м растворе ОЭГ_{n=30} (рис. 6, В; кривая 2) существенно не повлияло на процентное распределение эритроцитов по диаметру относительно контроля. Пики этих эритроцитометри-

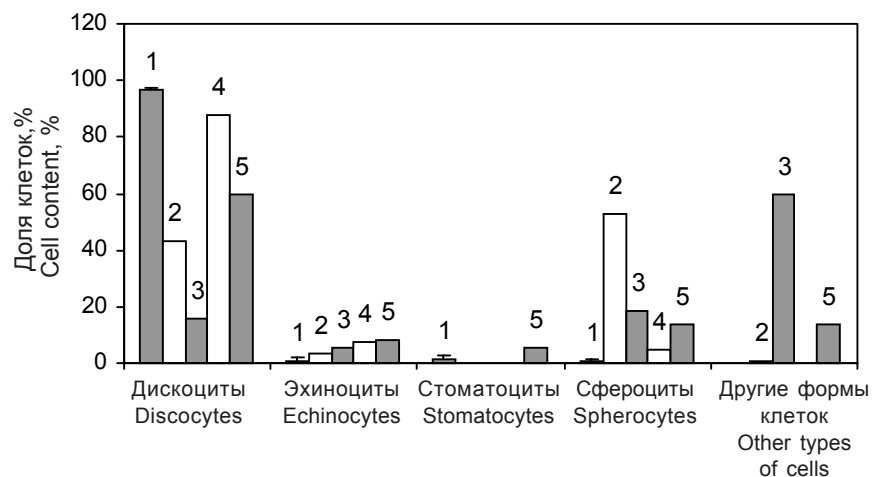


Рис. 4. Количественное содержание морфологических форм эритроцитов (%) после охлаждения-отогрева в растворах ОЭГ_{n=25} и ОЭГ_{n=30}: 1 – аутологичная плазма; 2 – 20% ОЭГ_{n=25}; 3 – 20% ОЭГ_{n=30}; 4 – 30% ОЭГ_{n=25}; 5 – 30% ОЭГ_{n=25}.

Fig. 4. Amount of erythrocytes (%) of different morphologic shapes after cooling/warming in solutions OEG_{n=25} and OEG_{n=30}: 1 – autologous plasma; 2 – 20% OEG_{n=25}; 3 – 20% OEG_{n=30}; 4 – 30% OEG_{n=25}; 5 – 30% OEG_{n=25}.

erythrocytes in 20 and 30% OEG_{n=25} solutions the peaks of erythrometric curves were in the range of 7.1–8.0 mm, corresponding to the control value (Fig. 3A and B, curves 2 and 3). In this case we observed the tendency to an increase in a cell diameter. Comparing to the control the share of red blood cells with a diameter of 8.1–9.0 mm significantly enhanced. In addition, the cells with a 9.1–10.0 mm diameter were found. In 30% OEG_{n=25} solution their share was higher than in 20% solution of the cryoprotectant (Fig. 3, curve 3). After exposure to 20 and 30% OEG_{n=30} solutions we noted a significant increase in erythrocyte diameter if compared with the control (Fig. 3B), as evidenced by a shift in the peak of erythrometric curve towards the range of 8.1–9.0 mm. When comparing the data of erythrometric curves (Fig. 3A and B, curves 2 and 3) after interaction of erythrocytes with 30% solution of OEG_{n=30} the largest share of cells with an increased diameter was revealed.

At the next stage of investigations we examined the preservation of erythrocytes shape and diameter after warming-cooling cycle in cryoprotective media based on non-penetrating cryoprotectants OEG_{n=25} and OEG_{n=30}. For this purpose, the ratio of different morphological cell forms was assessed in the warmed samples. Frozen-thawed suspension of red blood cells contained discocytes, stomatocytes, echinocytes, spherocytes and deformed cells (Fig. 4). After freeze-thawing of erythrocytes in 20% OEG_{n=25} solution the pronounced spherocytosis (more than 50% of total cell population) was observed, the amount of discocytes was (43.11 ± 0.06)%. Furthermore,

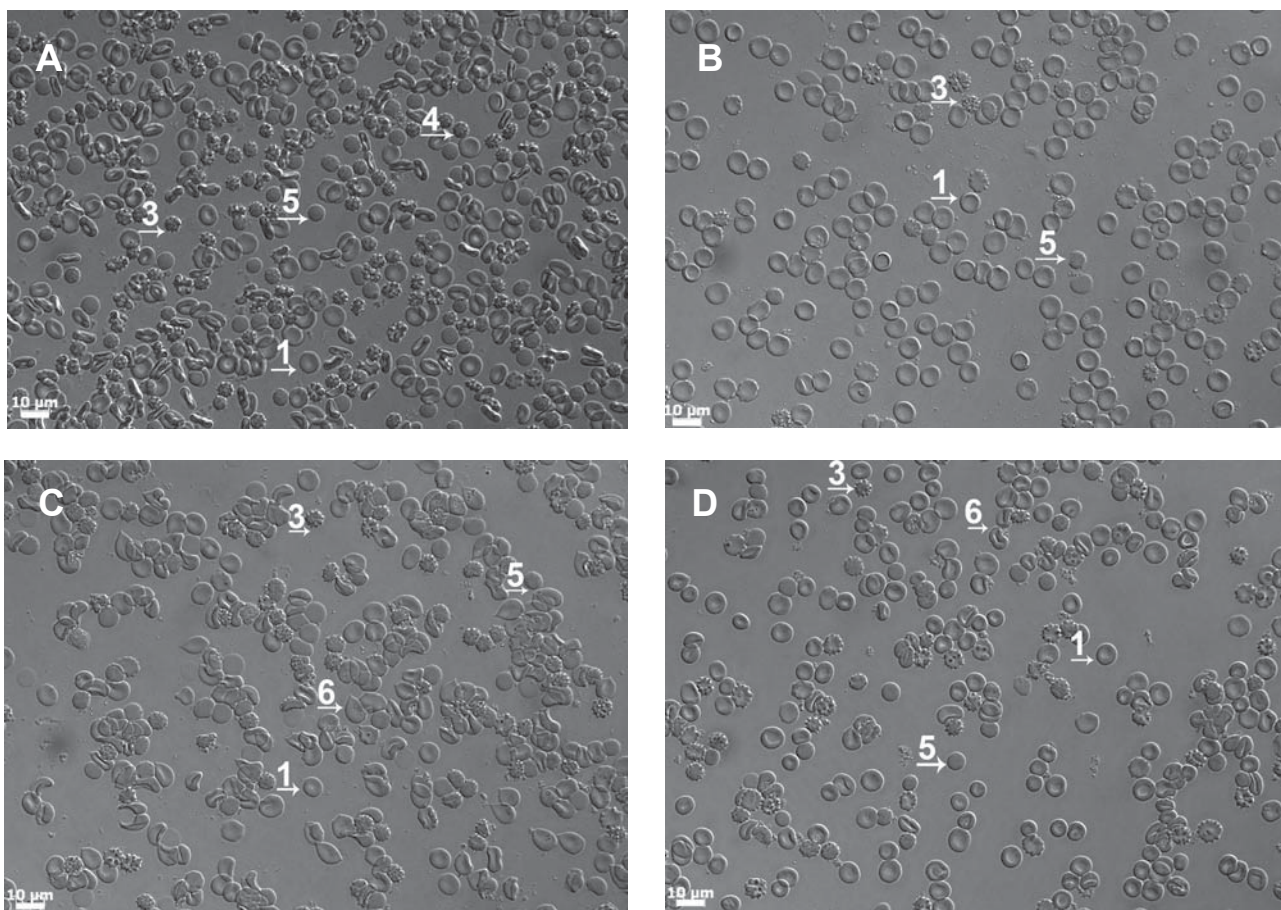


Рис. 5. Морфологические формы эритроцитов после охлаждения-отогрева в растворах ОЭГ_{n=25} и ОЭГ_{n=30} (1 – дискоцит, 2 – стоматоцит, 3 – эхиноцит, 4 – сфероэхиноцит, 5 – сфероцит, 6 – деформированные эритроциты); **А** – 20% ОЭГ_{n=25}, **В** – 30% ОЭГ_{n=25}, **С** – 20% ОЭГ_{n=30}, **Д** – 30% ОЭГ_{n=30}.

Fig. 5. Morphological types of erythrocytes after cooling/warming in solutions OEG_{n=25} and OEG_{n=30} (1 – discocyte, 2 – stomatocyte, 3 – echinocyte, 4 – spheroechinocyte, 5 – spherocyte, 6 – deformed erythrocyte); **A** – 20% OEG_{n=25}, **B** – 30% OEG_{n=25}, **C** – 20% OEG_{n=30}, **D** – 30% OEG_{n=30}.

ческих кривых соответствовали интервалу 7,1–8,0 мкм, а пик эритроцитометрической кривой после охлаждения-отогрева в 20%-м растворе ОЭГ_{n=30}, как и в контроле, – интервалу 7,1–8,0 мкм. Однако доля эритроцитов с таким диаметром уменьшилась (56,0%).

Данные проведенных исследований свидетельствуют о зависимости изменения формы и диаметра эритроцитов от концентрации и степени полимеризации криопротекторов как на этапе экспозиции, так и после замораживания-отогрева. Показано, что на этапе экспозиции эритроцитов в 40%-х растворах ОЭГ_{n=25} и ОЭГ_{n=30} образуются клеточные агрегаты. Согласно фазовой теории ассоциации эритроцитов [4] агрегация клеток в растворах водорастворимых полимеров может быть обусловлена коацервацией. Данное явление реализуется при условии превышения некоторого критического значения концентрации полимерных молекул в криозащитном растворе, определяемого свойствами полимеров, низкомолекулярных

spheroechinocytes and deformed cells (Fig. 5A) have been found in a frozen-thawed suspension. The shape of erythrocytes cryopreserved in 20% OEG_{n=30} solution has changed significantly after warming. Thus, the number of discocytes in the sample was just $(15.91 \pm 0.04)\%$, and the majority of cells $((60.0 \pm 0.07)\%)$ were deformed and did not meet the standard classification [4]. In suspension a small amount of spherocytes and echinocytes was revealed (Fig. 5C).

After cryopreservation of red blood cells with 30% OEG_{n=25} and OEG_{n=30} solutions there was a strong change in the shape of warmed cell if compared to 20% solutions of these cryoprotectants. Share of discoid cells after freeze-thawing in 30% OEG_{n=25} and OEG_{n=30} solutions was increased and reached (87.50 ± 0.06) and $(59.40 \pm 0.08)\%$, respectively (Fig. 5B and D). The amount of spherocytes and deformed cells significantly decreased in the samples. In particular, after cryopreservation in a 30% OEG_{n=25} solution the share of spherocytes decreased by more than 3 times, and that for deformed cells did by 4.4 times after



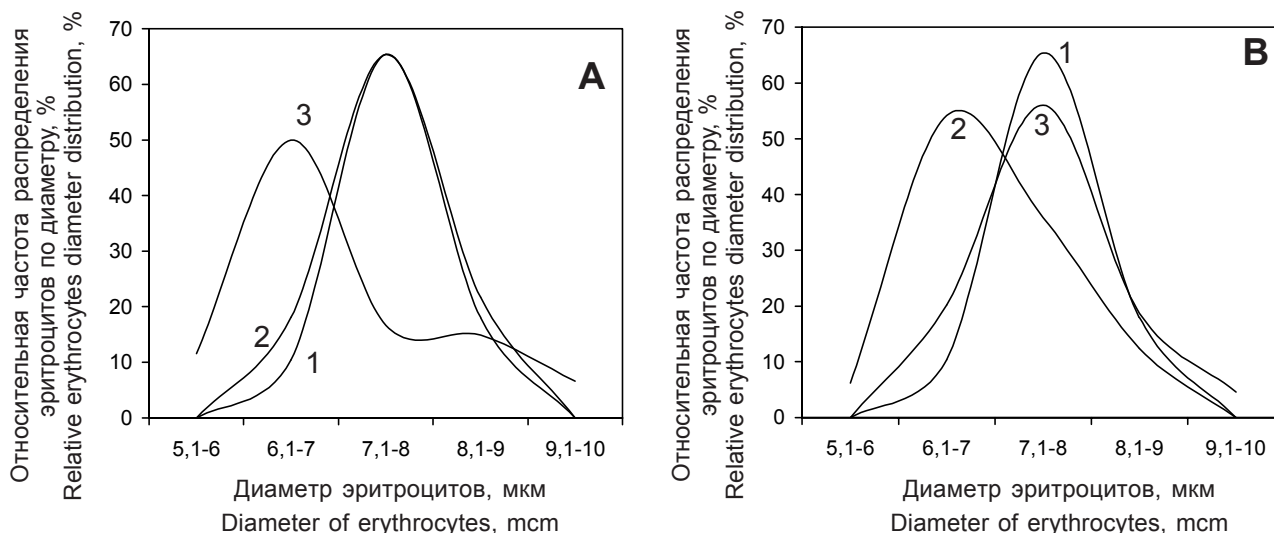


Рис. 6. Диаметр эритроцитов после охлаждения-отогрева в растворах ОЭГ_{n=25} (А) и ОЭГ_{n=30} (В): 1 – контроль, 2 – 30%-е растворы ОЭГ_{n=25} и ОЭГ_{n=30}, 3 – 20%-е растворы ОЭГ_{n=25} и ОЭГ_{n=30}.
Fig. 6. Diameter of erythrocytes after cooling/warming in solutions OEG_{n=25} (A) and OEG_{n=30} (B): 1 – control, 2 – 30% OEG_{n=25} and OEG_{n=30}, 3 – 20% OEG_{n=25} and OEG_{n=30}.

компонентов раствора и самих эритроцитов [1, 4, 23]. Одна из двух новых фаз представляет собой коллоидный раствор, а именно раствор высокомолекулярных полимеров, обедненный эритроцитами, другая – ассоциаты эритроцитов, обедненные компонентами среды. Структура «эритроцитарной фазы» может иметь вид «монетных столбиков», их сетей или агрегатов эритроцитов. После экспозиции в 40%-х растворах ОЭГ_{n=25} и ОЭГ_{n=30} структура «эритроцитарной фазы» представлена агрегатами из эритроцитов, что исключает применение данных растворов в качестве криозащитных сред для криоконсервирования эритроцитов.

Увеличение доли эритроцитов, имеющих форму стоматоцитов в присутствии ОЭГ_{n=30} указывает на способность этого вещества вызывать стоматоцитоз. Вероятно, ОЭГ_{n=30}, являясь гидрофобным поверхностно-активным веществом, способен не только адсорбироваться на поверхности мембраны, но и взаимодействовать с ее липидным бислоем. Ранее было показано [7, 8, 29], что непроникающие криопротекторы полиэтиленоксид-1500, поливиниловый спирт, гидроксиэтилкрахмал вызывают изменение липидной асимметрии мембран эритроцитов и относительного содержания их белкового состава. Установлено, что клетки в растворах полиэтиленоксида-1500 трансформируются в стоматоциты [2, 10], а одним из факторов, влияющих на изменение формы эритроцитов, является состояние липидного бислоя и цитоскелета [21, 26]. G.B. Quan и соавт. считают, что образование стоматоцитов связано с увеличением площади внутреннего липидного монослоя клеточной мембраны и может

cryopreservation in a 30% solution OEG_{n=30}. Herewith in 30% OEG_{n=25} and OEG_{n=30} solutions we noted the appearance of erythrocytes shaped as stomatocytes and echinocytes.

Erythrometric analysis showed that after cryopreservation in 20% OEG_{n=25} and 30% OEG_{n=30} solutions in warmed cells the diameter was significantly reduced *versus* the control. These changes were evidenced by a shift of distribution peak within the range of 6.0–7.0 mm, as well as the appearance of cells with 5.1–6.0 mm diameter (Fig. 6). Cryopreservation of red blood cells in 30% OEG_{n=25} solution (Fig. 6, curve 3) and 20% OEG_{n=30} solution (Fig. 6, curve 2) did not significantly affect the distribution of erythrocytes by the diameter relative to control. The peaks of these erythrocytometric curves corresponded to 7.1–8.0 mm interval, and the peak of erythrocytometric curve after freeze-thawing in 20% solution OEG_{n=30}, as well in the control fitted the interval of 7.1–8.0 mm. However, the share of red blood cells with such a diameter decreased (56.0%).

These findings indicate to the dependence of changes in the erythrocyte shape and diameter *versus* concentration and polymerization degree of cryoprotectants both at the exposure stage and after freeze-thawing. It has been shown that at the stage of erythrocyte exposure in 40% OEG_{n=25} and OEG_{n=30} solutions the cell aggregates were formed. According to the phase theory of erythrocytes' association [26], aggregation of cells in solutions of water-soluble polymers may be due to coacervation. This phenomenon is implemented in case of exceeding a certain critical concentration of polymer molecules in cryoprotective solution,

быть обусловлено деполяризацией мембраны [20], а также изменением внутриклеточного pH [19].

Установлено, что деконсервированная суспензия клеток, замороженных в растворах ОЭГ_{n=25} и ОЭГ_{n=30}, представляет собой гетерогенную популяцию, содержащую дискоциты, стоматоциты, эхиноциты, сфероциты, сфероэхиноциты и деформированные клетки. Наибольшее количество эритроцитов дискоидной формы было получено после цикла охлаждения-отогрева в 30%-х растворах ОЭГ_{n=25} и ОЭГ_{n=30}. При этом наибольшая доля дискоцитов была получена при криоконсервировании эритроцитов в 30%-м растворе ОЭГ_{n=25}.

Морфометрические исследования показали, что диаметр основной популяция эритроцитов после охлаждения-отогрева в 20%-м растворе ОЭГ_{n=30} и 30%-м растворе ОЭГ_{n=25} соответствовал норме (7,1–8,0 мкм), а после криоконсервирования эритроцитов в 20%-м растворе ОЭГ_{n=25} и 30%-м растворе ОЭГ_{n=30} диаметр клеток уменьшался.

Таким образом, показано, что оксиэтилированные производные глицерина со степенью полимеризации $n = 25$ и $n = 30$ способствуют сохранению формы и диаметра эритроцитов на этапах криоконсервирования. При этом характер изменения их формы и диаметра до и после криоконсервирования зависит от степени полимеризации и концентрации криопротектора.

Выводы

1. Установлено, что эритроциты после экспозиции в 20- и 30%-х растворах ОЭГ_{n=25} и 20%-м растворе ОЭГ_{n=30} сохраняли дискоидную форму, а в 30%-м растворе ОЭГ_{n=30} клетки трансформировались в стоматоциты. Экспозиция эритроцитов в 40%-х растворах ОЭГ_{n=25} и ОЭГ_{n=30} вызывала образование агломератов и приводила к значительной деформации клеток.

2. Показано, что диаметр эритроцитов увеличился после экспозиции в растворах ОЭГ_{n=30} до 8,1–9,0 мкм, а после экспозиции в растворе ОЭГ_{n=25} находился в пределах нормы (7,1–8,0 мкм).

3. После криоконсервирования эритроцитов в 30%-х растворах ОЭГ_{n=25} и ОЭГ_{n=30} была выявлена высокая сохранность клеток с дискоидной формой.

4. Установлено, что диаметр эритроцитов уменьшался после криоконсервирования в 20%-м растворе ОЭГ_{n=25} и 30%-м растворе ОЭГ_{n=30}, а в 30%-м растворе ОЭГ_{n=25} и 20%-м растворе ОЭГ_{n=30} соответствовал норме (7,1–8,0 мкм).

5. Данные морфологического и морфометрического анализа подтвердили перспективность применения 30%-го раствора ОЭГ_{n=25} для создания метода, не требующего удаления криопротектора из клеточной взвеси после криоконсервирования.

determined by the properties of polymers, low molecular weight components of the solution and erythrocytes *per se* [1, 4, 17]. One of the two new phases is a colloidal solution, namely a solution of high molecular weight polymers, erythrocytes depleted, another is the erythrocyte associates, depleted of media components. The structure of the 'erythrocyte phase' could be uniform, network-like or as aggregates of red blood cells. The structure of the 'erythrocyte phase' after exposure to 40% OEG_{n=25} and OEG_{n=30} solutions was presented by aggregates of erythrocytes, that excluded the application of these solutions as cryoprotective media for cryopreservation of red blood cells.

A rise in the share of erythrocytes shaped as stomatocytes in the presence of OEG_{n=30} indicated to the ability of this substance to cause stomatocytosis. Probably OEG_{n=30} as a hydrophobic surfactant, can not only be adsorbed on a membrane surface, but also interact with its lipid bilayer. It has previously been demonstrated [27–29] that non-penetrating cryoprotectants such as polyethylene oxide-1500, polyvinyl alcohol, hydroxyethyl caused a change in lipid asymmetry of erythrocytes membranes and relative content of their protein composition. It has been found that the cells in PEO-1500 solutions were transformed into stomatocytes [2, 14], and one of the factors affecting the change in erythrocytes was the state of lipid bilayer and cyto-skeleton [11, 21]. G.B. Quan *et al.* believe that the formation of stomatocytes was associated with increased area of inner lipid monolayer of cell membrane and might be due to membrane depolarization [8], as well as changes in intracellular pH [7].

It was established that frozen-thawed suspension of cells, frozen in solutions OEG_{n=25} and OEG_{n=30}, represented a heterogeneous population, containing discocytes, stomatocytes, echinocytes, spherocytes, spheroechinocytes and deformed cells. The largest amount of discoid shaped red blood cells was obtained after cooling-warming cycle in 30% OEG_{n=25} and OEG_{n=30} solutions. The largest share of discocytes was obtained following cryopreservation of red blood cells in 30% solution OEG_{n=25}. Morphometric studies have shown that the diameter of erythrocytes in main population after freeze-thawing in 20% OEG_{n=30} and 30% OEG_{n=25} solutions was normal (7.1–8.0 mm), and after cryopreservation of red blood cells in 20% OEG_{n=25} and a 30% OEG_{n=30} solutions the diameter of cells decreased.

Thus, it has been demonstrated that the oxyethylated glycerol derivatives with $n = 25$ and $n = 30$ polymerization degree were able to maintain the shape and diameter of erythrocytes at cryopreservation stages. The origin of changes in their shape and diameter before and after cryopreservation depended upon polymerization degree and concentration of cryoprotectant.



Литература

1. Альбертсон П.О. Разделение клеточных частиц и макромолекул / Под ред. П.О. Альбертсон. – М.: Мир, 1974. – 382 с.
2. Бабийчук Л.А. Конформационные изменения эритроцитов под влиянием криопротектора ПЭО-1500 // Проблемы криобиологии. – 1997. – №1–2. – С. 95–99.
3. Бабийчук Л.А., Землянских Н.Г. Оптимизация и преимущества безотмывочного метода криоконсервирования эритроцитов с ПЭО-1500 // Проблемы криобиологии. – 2001. – №1. – С. 35–41.
4. Воейков В.Л. Физико-химические и физиологические аспекты реакции оседания эритроцитов // Успехи физиол. наук. – 1998. – Т. 29, №4. – С. 55–73.
5. Грачев А.Е., Накастоев И.М., Гемдзян Э.Г. и др. Влияние длительности криоконсервирования эритроцитов на качество и эффективность их трансфузий // Гематология и трансфузиология. – 2013. – Т. 58, №2. – С. 32–36.
6. Гучок В.М., Козлова В.Ф. О кумулятивных свойствах 1,2-пропандиола, глицерина и оксиэтилированного глицерина с молекулярной массой 1412 и выносливости к ним крыс // Криобиология и криомедицина. – 1983. – Вып.11. – С. 24–28.
7. Зубов П.М., Землянских Н.Г., Бабийчук Л.А. Модификация белкового состава мембрано-цитоскелетного комплекса эритроцитов под влиянием ПЭО-1500 // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т.16, №2. – С. 164–175.
8. Зубов П.М. Изменение липидной асимметрии мембран эритроцитов кордовой и донорской крови при криоконсервировании с ПЭО-1500 // Вестник проблем биологии и медицины. – 2013. – Т. 2, №2. – С. 109–112.
9. Козлова В.Ф. Морфологические аспекты реакции клеток, тканей и органов на введение оксиэтилированного глицерина (ОЭГ) в организм животных // Криобиология и криомедицина. – 1980. – Вып. 6. – С. 29–34.
10. Кулешова Л.Г. Трансформация эритроцитов человека в растворах неэлектролитов ряда Н-спиртов. Часть 1. Морфологический аспект взаимодействия // Проблемы криобиологии. – 1999. – №1. – С. 9–13.
11. Лубяный В.Г., Бредихина Л.П., Шраго М.И. Криопротекторная активность олигомеров ОЭГ в низкотемпературном консервировании эритроцитов // Криобиология и криомедицина. – 1981. – Вып. 8. – С. 34–40.
12. Павлова Т.В., Позднякова Н.М., Прощаев К.И. Изменения морфофункциональных свойств эритроцитов и содержания кислорода в них у пациентов с риском преждевременного старения // Донозоология: Тезисы материалов, 7-я Международная науч. конф., 15–16 декабря, 2011 г. – СПб, 2011. – С. 446–448.
13. Терехов Н.Т., Полуобяринова А.Г., Кушко О.В. Функциональное состояние эритроцитов, замороженных с ПВП, и их клиническое изучение // Проблемы гематологии и переливания крови. – 1977. – №2. – С. 16–19.
14. Шраго М.И., Калугин Ю.В., Кочуровская Г.Г. и др. Влияние оксиэтилирования на некоторые физико-химические и биологические характеристики глицерина // Криобиология и криомедицина. – 1976. – Вып. 2. – С. 31–33.
15. Єсіпова Ю.С., Ніколенко О.В., Компанієць А.М. Кріозахисна дія оксиетильованого гліцерину зі ступенем полімеризації $n = 30$ при заморожуванні еритроцитів людини // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, №1. – С. 114–118.
16. Компанієць А.М., Ніколенко О.В., Чеканова В.В. та ін. Кріозахисна ефективність середовищ на основі оксиетильних похідних поліолів при заморожуванні еритроцитів людини // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, №3. – С. 229–301.
17. Bessis M. Living blood cells and their ultrastructure. – New York: Springer Verlag, 1973. – 767 p.
18. Chang A., Kim Y., Hoehn R., Jernigan P. Cryopreservation packed red blood cells in surgical patients: past, present and future // Blood Transfusion. – 2016. – Vol. 8, №1 – P. 1–7.

Conclusions

1. It has been established that erythrocytes after exposure to 20 and 30% OEG_{n=25} solutions and 20% OEG_{n=30} solution retained a discoid shape, and in a 30% OEG_{n=30} solution the cells transformed into stomatocytes. Exposure of erythrocytes in 40% solutions OEG_{n=25} and OEG_{n=30} caused the formation of agglomerates and led to a significant deformation of cells.

2. It has been demonstrated that the diameter of erythrocytes was increased after exposure to solutions OEG_{n=30} to 8.1–9.0 mm and after exposure to OEG_{n=25} solutions it was within the normal range (7.1–8.0 mm).

3. After cryopreservation of red blood cells in 30% OEG_{n=25} and OEG_{n=30} solutions a high preservation rate of the discoid shaped cells was found.

4. It has been found that the diameter of erythrocytes diminished after cryopreservation in a 20% OEG_{n=25} solution and a 30% solution OEG_{n=30}, and a 30% solution OEG_{n=25} and a 20% solution OEG_{n=30} it corresponded normal (7.1–8.0 microns).

5. Morphological and morphometric analysis confirmed the prospects of using a 30% OEG_{n=25} solution to create a method which does not require a cryoprotectant removal from cell suspension after cryopreservation.

References

1. Albertson P.A. Partition of cell particles and macromolecules. Stockholm: Almqvist and Wiksell; 1971.
2. Babijchuk L.A. Conformation changes in erythrocytes under the effect of PEO-1500 cryoprotection. Probl Cryobiol 1997; 1–2: 95–99.
3. Babijchuk L.A., Zemlyanskikh N.G. Optimization and advantages of washing-out method for erythrocytes cryopreservation with PEO-1500. Probl Cryobiol 2001; 1: 35–41.
4. Bessis M. Living blood cells and their ultrastructure. New York: Springer Verlag; 1973.
5. Chang A., Kim Y., Hoehn R., Jernigan P. Cryopreservation packed red blood cells in surgical patients: past, present and future. Blood Transfusion 2016. 8 (1): 1–7.
6. Esipova Y.S., Nikolenko A.V., Kompaniets A.M. Cryoprotective effect of oxyethylated glycerol with $n = 30$ polymerisation degree under human erythrocytes freezing. Probl Cryobiol 2008; 18 (1): 114–118.
7. Gedde M.M. Yang E., Huestis W.H. Membrane potential and human erythrocyte shape. Biophys J 1997; 72 (3): 1220–1233.
8. Glaser R., Fujii T., Muller P. et al. Erythrocyte shape dynamics influence of electrolyte conditions and membrane potential. Biomed Biochim Acta 1987; 46 (2): 327–333.
9. Grachev A.Ye., Nakastoev I.M., Gemdzhian E.G. et al. Effect of duration of cryopreservation of erythrocytes on quality and efficiency of their transfusions. Gematologiya i Transfusiologiya 2013; 58 (2): 32–36.
10. Guchok V.M., Kozlova V.F. On cumulative properties of 1,2-propanediol, glycerol and oxyethylated glycerol m.w. 1412 and their tolerance by rats. Kriobiologiya i Kriomeditsyna 1983; 11: 24–28.
11. Khary K., Foo J., Howard J. Shapes of red blood cells: comparison of 3D confocal images with the bilayer-coupe model. Cell Mol Bioeng 2010; 1 (2–3): 173–181.



19. Gedde M.M., Yang E., Huestis W.H. Membrane potential and human erythrocyte shape // *Biophys. J.* – 1997. – Vol. 72, №3. – P. 1220–1233.
20. Glaser R., Fujii T., Muller P. et al. Erythrocyte shape dynamics influence of electrolyte conditions and membrane potential // *Biomed. Biochim. Acta.* – 1987. – Vol. 46, №2–3. – P. S327–S333.
21. Khary K., Foo J., Howard J. Shapes of red blood cells: Comparison of 3D Confocal Images with the Bilayer-Coupe Model // *Cell. Mol. Bioeng.* – 2010. – Vol. 1, №2–3. – P. 173–181.
22. Macclak A., Bukowska B., Michalowicz J. Comparative study of the effect of BPA and its selected analogues on hemoglobin oxidation, morphological alterations and hemolytic changes in human erythrocytes // *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol Pharmacol.* – 2015. – Vol. 176. – P. 62–70.
23. Miheeva L.M., Zaslavsky B.Y., Rogozhin S.V. Choice of an aqueous polymer two-phase system for cell partition // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1978. – Vol. 542, №1. – P. 101–106.
24. Pellerin-Mendes C., Million L., Marchand-Arvier M. et al. In vitro study of the protective effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen // *Cryobiology.* – 1997. – Vol. 35, №2. – P. 173–186.
25. Roback D. Perspective on the impact of storage duration on blood quality and transfusion outcomes // *Vox Sang.* – 2016. – Vol. 111, №4 – P. 357–364.
26. Sheet M.P., Singer S.J., Biological membranes as bilayer couples. A mechanism of drug-erythrocyte interaction // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1974. – Vol. 71, №11. – P. 4457–4461.
27. Sputtek A., Langer R., Singbartl G. Cryopreservation of red blood cells with the non-penetrating cryoprotectant hydroxyethyl starch // *CryoLetters.* – 1995. – Vol. 16, №2. – P. 283–288.
28. Quan G.B., Zhang L., Guo Y. et al. Intracellular sugars improve survival of human red blood cells cryopreservation at –80°C in the presence of polyvinylpyrrolidone and human serum albumin // *CryoLetters.* – 2008. – Vol. 28, №2. – P. 95–108.
29. Weng X., Cloutier G., Pibarot P. et al. Comparison and simulation of different levels of erythrocyte aggregation with pig, horse, sheep, calf, and normal human blood // *Biorheology.* – 1996. – Vol. 33, №4. – P. 365–377.
12. Kompaniets A.M., Nikolenko A.V., Chekanova V.V., Yesipova Y.S. Cryoprotective efficiency of media based on oxyethyl derivatives of polyols during freezing of human erythrocytes. *Probl Cryobiol* 2008; 18 (3): 229–301.
13. Kozlova V.F. Morphological aspects of cell, tissue and organ response to oxyethylated glycerol (OEG) administered to animal's body. *Kriobiologiya i Kriomeditsyna* 1980; 6: 29–34.
14. Kuleshova L.G. Transformation of human erythrocytes in the solutions of non-electrolytes of H-Alcohol series. Part 1. Morphological aspect of interaction. *Probl Cryobiol* 2006; 16: 164–175.
15. Lybyany V.G., Bredikhina L.P., Shrago M.I. The cryoprotectant activity of GOE oligomers in low-temperature erythrocytes preservation. *Kriobiologiya i Kriomeditsyna* 1981; 8: 34–40.
16. Macczak A., Bukowska B., Michalowicz J. Comparative study of the effect of BPA and its selected analogues on hemoglobin oxidation, morphological alterations and hemolytic changes in human erythrocytes. *Comp Biochem Physiol and Toxicol Pharmacol* 2015; 176: 62–70.
17. Miheeva L.M., Zaslavsky B.Y., Rogozhin S.V. Choice of an aqueous polymer two-phase system for cell partition. *Biochim Biophys Acta.* 1978; 542 (1): 101–106.
18. Pavlova T.V., Pozdnyakova N.M., Proschayev K.I. Change in morphofunctional properties of erythrocytes and content of oxygen in them in patients with risk of premature ageing. *Donozologiya: Proc. of Rep. the 7th International Scientific Conference*; 2011 Dec 15-16; St-Petersburg, Russian; 2011: 446–448.
19. Pellerin-Mendes C., Million L., Marchand-Arvier M. et al. In vitro study of the protective effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen. *Cryobiology* 1997; 35 (2): 173–186.
20. Roback D. Perspective on the impact of storage duration on blood quality and transfusion outcomes. *Vox Sang* 2016; 111 (2): 357–364.
21. Sheet M.P., Singer S.J., Biological membranes as bilayer couples. A mechanism of drug-erythrocyte interaction. *Proc Natl Acad Sci* 1974; 71: 4457–4461.
22. Shrago M.I., Kalugin Yu.V., Kochurovskaya G.G. et al. Effect of oxyethylation on some physical-chemical and biological characteristics of glycerol. *Kriobiologiya i Kriomeditsyna* 1976; 2: 31–32.
23. Sputtek A., Langer R., Singbartl G. Cryopreservation of red blood cells with the non-penetrating cryoprotectant hydroxyethyl starch. *CryoLetters* 1995; 16 (2): 283–288.
24. Terekhov N.T., Poluboyarinova A.G., Kushko O.V. Functional state of erythrocytes frozen with PVP and their clinical study. *Problemy Gematologii i Perelivaniya Krovi* 1977; 2: 16–19.
25. Quan G.B., Zhang L., Guo Y. et al. Intracellular sugars improve survival of human red blood cells cryopreservation at –80°C in the presence of polyvinylpyrrolidone and human serum albumin. *CryoLetters* 2008; 28 (2): 95–108.
26. Voejkov V.L. Physical-chemical and physiological aspects of erythrocytes sedimentation reaction. *Uspekhi Fiziologicheskikh Nauk* 1998; 29 (4): 55–73.
27. Weng X., Cloutier G., Pibarot P. et al. Comparison and simulation of different levels of erythrocyte aggregation with pig, horse, sheep, calf, and normal human blood. *Biorheology* 1996; 33 (4): 365–377.
28. Zubov P.M., Zemlyanskikh N.G., Babichyk L.A. Modification of pro-teín composition of erythrocyte membrane-cytoskeletal comp-lex under PEO-1500 effect. *Probl Cryobiol* 2006; 16 (pt. 2): 164–175.
29. Zubov P.M. Change in lipid asymmetry of erythrocyte membranes of cord and donor's blood when cryopreserving with PEO-1500. *Vestnik Problem Biologii i Meditsyny* 2013; 2(2): 109–112.

