Probl Cryobiol Cryomed 2019; 29(3):255–265
https://doi.org/10.15407/cryo29.03.255

оригінальне дослідження research article

УДК 57.086.13:591.111.1:547.42:535.37

П.Ю. Улізко[1]*, О.М. Боброва[1], О.А. Нардід[1,2], П.М. Зубов[1],
І.Ф. Коваленко[1], В.М. Кучков[2], Л.А. Водоп'янова[3]

Кріоконсервування еритроцитів коня і бика із застосуванням комбінованих захисних середовищ

UDC 57.086.13:591.111.1:547.42:535.37

P.Yu. Ulizko[1]*, O.M. Bobrova[1], O.A. Nardid[1,2], P.M. Zubov[1],
I.F. Kovalenko[1], V.M. Kuchkov[2], L.A. Vodopianova[3]

Cryopreservation of Equine and Bovine Erythrocytes Using Combined Protective Media

Реферат: У роботі проведено порівняльний аналіз ефективності кріоконсервування еритроцитів коня і бика з застосуванням однокомпонентного (20% ДМСО) і комбінованого (10% ДМСО, 20% ПЕО-1500) захисних середовищ. Методами флуоресцентної мікроскопії та проточної цитофлуориметрії встановлено, що флуоресцентний барвник 3-DAB забарвлює мембрани еритроцитів і може застосовуватися для оцінки їх стану на всіх етапах кріоконсервування. Виявлено, що використання комбінованих захисних середовищ дозволяє значно покращити результати кріоконсервування еритроцитів коня і бика у порівнянні з однокомпонентними середовищами. За цитофлуориметричними даними встановлено, що показники еритроцитів коня після кріоконсервування у середовищі на основі ДМСО не відповідали контрольним, навіть після відмивання від кріопротектора, а після заморожування у комбінованому захисному середовищі і відмивання від кріопротекторів вони відповідали контрольним. Посилення флуоресценції мембран еритроцитів коня і бика та зміни їх стану на цитограмах після змішування з 20%-м розчином ДМСО свідчать про його потужну мембранотропну дію. Рівень гемолізу еритроцитів коня і бика після застосування комбінованого захисного середовища на всіх етапах кріоконсервування значуще нижчий, ніж після використання 20%-го розчину ДМСО.

Ключові слова: кріоконсервування, еритроцити коня, еритроцити бика, комбіновані кріоконсервуючі середовища, гемоліз, флуоресцентний барвник.

Реферат: В работе проведен сравнительный анализ эффективности криоконсервирования эритроцитов коня и быка с применением однокомпонентной (20% ДМСО) и комбинированной (10% ДМСО, 20% ПЭО-1500) защитных сред. Методами флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии установлено, что флуоресцентный краситель 3-DAB окрашивает мембраны эритроцитов и может применяться для оценки их состояния на всех этапах криоконсервирования. Выявлено, что применение комбинированных защитных сред позволяет значительно улучшить результаты криоконсервирования эритроцитов коня и быка по сравнению с однокомпонентными средами. По цитофлуориметричным данным установлено, что показатели эритроцитов коня после криоконсервирования в среде на основе ДМСО не соответствовали контрольным, даже после отмывания от криопротектора, а после замораживания в комбинированной криозащитной среде и отмывания от криопротекторов они соответствовали контрольным. Усиление флуоресценции мембран эритроцитов лошади и быка и изменения их состояния на цитограммах после смешивания клеток с 20% ДМСО свидетельствует о его сильном мембранотропном действии. Уровень гемолиза эритроцитов коня и быка после применения комбинированной защитной среды на всех этапах криоконсервирования значимо ниже, чем после использования 20%-го раствора ДМСО.

Ключевые слова: криоконсервирование, эритроциты коня, эритроциты быка, комбинированные криозащитные среды, гемолиз, флуоресцентный краситель.

Abstract: The cryopreservation effectiveness for equine and bovine erythrocytes with the use of one component (20% DMSO) and combined (10% DMSO, 20% PEO-1500) protective medium was comparatively analyzed. Using fluorescence microscopy and flow cytometry, the 3-DAB fluorescent dye has been shown to stain the membranes of red blood cells and can be used to evaluate their condition at all cryopreservation stages. It was found that the use of combined protective medium can significantly improve the results of cryopreservation of equine and bovine red blood cells in comparison with one-component media. By cytometric data it has been established that the parameters of equine erythrocytes after freezing-thawing in DMSO-based medium did not correspond the control even after cryoprotectant removal, but after freezing-thawing in combined cryoprotective medium and cryoprotectant washing-out they corresponded to the control. The increased fluorescence in equine and bovine erythrocytes membranes and changes in cytograms after mixing the cells with 20% DMSO suggested its strong membranotropic influence. Hemolysis level after applying a combined cryoprotective medium of equine and bovine erythrocytes was significantly lower at all cryopreservation stages than that when 20% DMSO was applied.

Key words: cryopreservation, equine red blood cells, bovine red blood cells, combined cryopreservation medium, hemolysis, fluorescent dye.

[1]Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків
[2]Харківський національний університет ім. В.Н.Каразіна, м. Харків
[3]Харківська державна зооветеринарна Академія, м. Харків

***Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:**
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: okzilu.pavel@gmail.com

Надійшла 01.11.2018
Прийнята до друку 03.09.2019

[1]Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine
[2]V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine
[3]Kharkiv State Zooveterinary Academy, Kharkiv, Ukraine

***To whom correspondence should be addressed:**
23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.:+380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: okzilu.pavel@gmail.com

Received November, 01, 2018
Accepted September, 03, 2019

© 2019 P.Yu. Ulizko, *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.

Компоненти крові тварин часто застосовуються в ветеринарній лікувальній практиці при отруєннях, значних крововтратах, порушеннях імунної системи та ін. [16, 19]. Пошук тварини-донора з відповідною групою крові та перевірка цієї крові на відсутність кровопаразитарних та інфекційних захворювань [13, 14] потребують тривалого часу, тому для термінових випадків важливо мати запаси крові з можливістю її тривалого зберігання в умовах кріобанку [12]. Показано, що на відміну від кріоконсервування еритроцитів людини заморожування клітин більшості видів тварин із використанням захисних середовищ на основі гліцерину або 1,2-пропандіолу неефективне [2, 7, 15]. Кріопротектор диметилсульфоксид (ДМСО) показав більш високу захисну дію по відношенню до еритроцитів коня, бика, котів та собак, але рівень гемолізу клітин після всіх етапів кріоконсервування виявився досить високим [2, 15]. У цьому зв'язку необхідним є пошук більш ефективних середовищ для кріоконсервування еритроцитів тварин. Застосування екзоцелюлярних кріозахисних сполук запезпечує низький рівень гемолізу еритроцитів після розморожування, але високі показники осмотичної крихкості не дозволяють їх використовувати для гемотрансфузій [2]. Виявлено, що для заморожування деяких видів біологічних об'єктів більш прийнятні комбіновані захисні середовища на основі ендо- та екзоцелюлярних сполук [15, 17].

На даний час у кріобіології широко застосовуються флуоресцентні методи аналізу клітин, проточна цитофлуориметрія та люмінесцентна мікроскопія із використанням флуоресцентних барвників, які реагують на зміну мікрооточення, мають високі сольватохромні показники і значне зростання квантового виходу під час зв'язування з біологічними об'єктами [1, 4, 18]. Так, флуоресцентний барвник 3-DAB (3-диметиламінобензантрон) – нейтральна речовина, яка практично не розчиняється у воді і чутлива до полярності оточення (сольватохромний ефект), володіє достатньою гідрофобністю для проникнення в біологічні об'єкти і нековалентного зв'язування з їх біомакромолекулами [4]. Важливо, що 3-DAB має високу фотохімічну стійкість і незначний квантовий вихід флуоресценції у водних середовищах, який у гідрофобній фазі різко збільшується, а у концентраціях 10^{-4}–10^{-3} М не виявляє токсичної дії на клітини [1].

Мета роботи – порівняння ефективності однокомпонентного і комбінованого захисних середовищ для кріоконсервування еритроцитів коня і бика.

Animal blood components are often used in veterinary medical practice during treatment of intoxications, significant blood loss, immune system disorders, *etc.* [13, 17]. Looking for a donor animal with a corresponding blood group and testing this blood for the absence of blood-parasitic and infectious diseases [10, 11] require a long time, therefore, in urgent cases, it is important to have the blood stocks with the possibility of long-term storage in cryobanks [9]. It has been shown that in contrast to cryopreservation of human red blood cells, the freezing of the cells of most animal species using protective media based on glycerol or 1,2-propanediol is ineffective [6, 12, 15]. The cryoprotectant dimethylsulfoxide (DMSO) showed a higher protective effect on erythrocytes of horses, bulls, cats and dogs, but the level of hemolysis of the cells after all the stages of cryopreservation was quite a high [6, 12]. Therefore it is necessary to find more effective media for cryopreservation of animal erythrocytes. The use of exocellular cryoprotective compounds results in a low level of erythrocyte hemolysis after thawing, but high osmotic fragility rates do not allow them to be used for hemotransfusion [6]. It has been found that in order to freeze the cells of certain species of animals is more suitable is the combination of protective media based on endo- and exocellular compounds [12, 14].

Currently, in cryobiology there are widely used the fluorescence methods of cell analysis, flow cytometry and luminescent microscopy using fluorescent dyes that respond to changing microenvironment and have high solvatochromic indices as well as a significant increase in quantum yield during binding to living macromolecules [4, 7, 16]. So, a fluorescent dye 3-DAB (3-dimethylaminobenzanthrone) is a neutral substance which is practically insoluble in water and is sensitive to polarity of the environment (solvatochromic effect), possesses sufficient hydrophobicity to penetrate into biological objects and non-covalently bind with their biomacromolecules [7]. It is important that 3-DAB has a high photochemical stability and slight quantum yield of fluorescence in aqueous media, sharply increasing in hydrophobic phase, in concentrations of 10^{-4}–10^{-3} M it does not toxically affect the cells [4].

The research aim was to compare the effectiveness of single-component and combined cryoprotective media to cryopreserve the equine and bovine red blood cells.

Materials and methods

Whole blood was obtained from the jugular vein of healthy, sexually mature male horses and

Матеріали і методи

Цільну кров отримували з яремної вени здорових статевозрілих самців коня і бика, яку стабілізували консервантом «Глюгіцир» («Біофарма», Україна). Усі тварини утримувалися в дослідному господарстві Харківської державної зооветеринарної академії (Україна). Експерименти проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447–IV від 21.02.2006 р.) із дотриманням вимог Комітету з біоетики Інституту, узгоджених із положенням «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986). Після видалення плазми еритромасу тричі відмивали центрифугуванням при 1300g протягом 3 хв у 4-кратному об'ємі фізіологічного розчину (pH 7,4).

Для заморожування зразків використовували два кріоконсервуючих середовища, виготовлених на фосфатно-сольовому буфері (0,15 М NaCl, 5 мМ натрій-фосфатний буфер, pH 7,4): 1 – 20% ДМСО; 2 – 10% ДМСО, 20% поліетиленоксиду-1500 (ПЕО-1500). Кріозахисне середовище додавали до відмитих еритроцитів краплинно у співвідношенні 1:1 та інкубували протягом 15 хв при кімнатній температурі. Зразки заморожували у полістіролових пробірках (4,0 мл) зануренням у рідкий азот, відігрівали на водяній бані (42°С) до появи рідкої фази. Від кріоконсервуючого середовища клітини один раз відмивали 0,6 М NaCl і два рази – 0,15 М NaCl на 5 мМ натрій-фосфатному буфері, pH 7,4. Рівень гемолізу на всіх етапах кріоконсервування вимірювали на спектрофотометрі «Pye Unicam SP 8000» («Pye Unicam Ltd», Велика Британія) і виражали у відсотках до 100% гемолізованих клітин.

Для забарвлення еритроцитів використовували флуоресцентний барвник 3-DAB («SETA BioMedicals», США) у концентрації 40 мкМ для мікроскопічних досліджень і 4 мкМ для цитофлуориметричних [4].

Клітини інкубували з барвником 15 хв і відмивали від вільного барвника центрифугуванням при 1300g протягом 3 хв. Флуоресцентні зображення еритроцитів отримували на флуоресцентному мікроскопі «AxioObserverZ1» («Carl Zeiss», Німеччина). Флуоресцентні характеристики еритроцитів, забарвлених зондами, досліджували за допомогою проточного цитофлуориметра «FACS Calibur» («Becton Dickinson», США). Флуоресценцію збуджували світ лом із довжиною хвилі 488 нм (аргоновий лазер). Кожний експеримент повторювали п'ять разів.

bulls, which was stabilized with the preservative 'Glugicir' (Biopharm, Ukraine). All animals were kept in the experimental farm of the Kharkiv State Zooveterinary Academy (Ukraine). Experiments were performed in accordance with the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty' (N 3447-IV of February 21st, 2006), in compliance with the requirements of the Bioethics Committee of the Institute, agreed with the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used in Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986). After removal of plasma, the erythromass was washed three times by centrifugation at 1300g for 3 minutes in 4-fold volume of physiological solution (pH 7.4).

To freeze the samples, two cryopreservation media, prepared with phosphate-buffered saline (0.15 M NaCl, 5 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4) were used: 1 – 20% DMSO; 2 – 10% DMSO, 20% polyethylene oxide-1500 (PEO-1500). The cryopreservation medium was added to the washed erythrocytes by droplets in a 1: 1 ratio and incubated for 15 minutes at room temperature. Samples were frozen in 4.0 ml polystyrene tubes by immersion into liquid nitrogen, heated in a water bath (42°C) until a liquid phase appeared. From the cryopreservation medium, the cells were once washed with 0.6 M NaCl and twice with 0.15 M NaCl on 5 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4. The level of hemolysis at all stages of cryopreservation was measured with a spectrophotometer 'Pye Unicam SP 8000' ('Pye Unicam Ltd', UK) and expressed as a percentage of 100% of hemolysed cells.

For the staining of red blood cells, 3-DAB (SETA BioMedicals, USA) fluorescence dye was used at a concentration of 40 μM for microscopic studies and at 4 μM for cytometric ones [7].

Cells were incubated with dye for 15 min and washed from excess dye by centrifugation at 1300g for 3 min. Fluorescent images of erythrocytes were obtained with fluorescent microscope AxioObserverZ1 (Carl Zeiss, Germany). The fluorescence characteristics of red blood cells, stained with probes, were studied using a flow cytometer 'FACS Calibur' (Becton Dickinson, USA). Fluorescence was excited by light with a wavelength of 488 nm (argon laser). Each experiment was repeated five times.

The results were statistically processed with the Student-Fisher test and the Microsoft Excel 2010 software (Microsoft, USA).

Results and discussion

Fig. 1 and 2 demonstrate the fluorescence images of equine and bovine red blood cells in control and

Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію Стьюдента-Фішера та програми «Microsoft Excel 2010» («Microsoft», США).

Результати та обговорення

На рис. 1 та 2 наведено флуоресцентні зображення еритроцитів коня і бика у контролі та на різних етапах кріоконсервування. Видно, що 3-DAB забарвлює мембрани еритроцитів ссавців, тому його можна використовувати для оцінки стану еритроцитів. Локалізація зонда в мембранах і внутрішньоклітинних структурах змінюється залежно від мікрооточення його молекул. Висловлено припущення, що молекули 3-DAB завдяки гідрофобним властивостям концентруються на початку неполярної ділянки ліпідів мембран клітин [1, 4]. Зв'язування барвника з мембранними і внутрішньоклітинними структурами, ймовірно, відбувається нековалентним гідрофобним шляхом, а місцем його локалізації є неполярні ділянки («кишені») біля макромолекул. Барвник 3-ДАБ частково проникає у внутрішньоклітинне середовище еритроцитів, дріжджів, сперматозоїдів людини, собак, крупної рогатої худоби тощо, але через високий вміст води флуоресценція від молекул зонда в цій ділянці нехтовно мала.

Після інкубації еритроцитів у розчині ДМСО посилюються флуоресценція частини клітин і зменшується їх діаметр (рис. 1, 2). Це може бути пов'язане зі зміною форми клітин, близькою до

at different stages of cryopreservation. It is apparent that 3-DAB stains the membranes of mammalian erythrocytes, so it can be used to evaluate their state. Localization of the probe in membranes and intracellular structures varies depending on the microenvironment of its molecules. The 3-DAB molecules, due to hydrophobic properties, are assumed to be concentrated at the border of nonpolar area of cell membrane lipids [4, 7]. The binding of the dye to membrane and intracellular structures probably is due to a non-covalent hydrophobic way, and the place of its localization is nonpolar areas ('pockets') near the macromolecules. The 3-DAB dye partially penetrates into intracellular medium of red blood cells, yeast, human sperm, dogs, cattle, *etc.*, but because of high water content, fluorescence from the probe molecules in this area is negligible.

After an incubation of erythrocytes in DMSO solution, the fluorescence of some cells is increases and the diameter of cells decreases (Fig. 1, 2). This may be due to a change in the shape of cells close to the spherical, and an increase in the permeability of membranes of some cells to the dye. The number of hydrophobic binding sites increases and, since the 3-DAB dye interacts with biological structures by hydrophobic mechanism, the fluorescence of erythrocytes is significantly enhanced. Such an effect was observed by I.A. Buriak *et al.* [4] during a partial damage to membranes, with a complete cell injury resulting in fluorescence quenching by water.

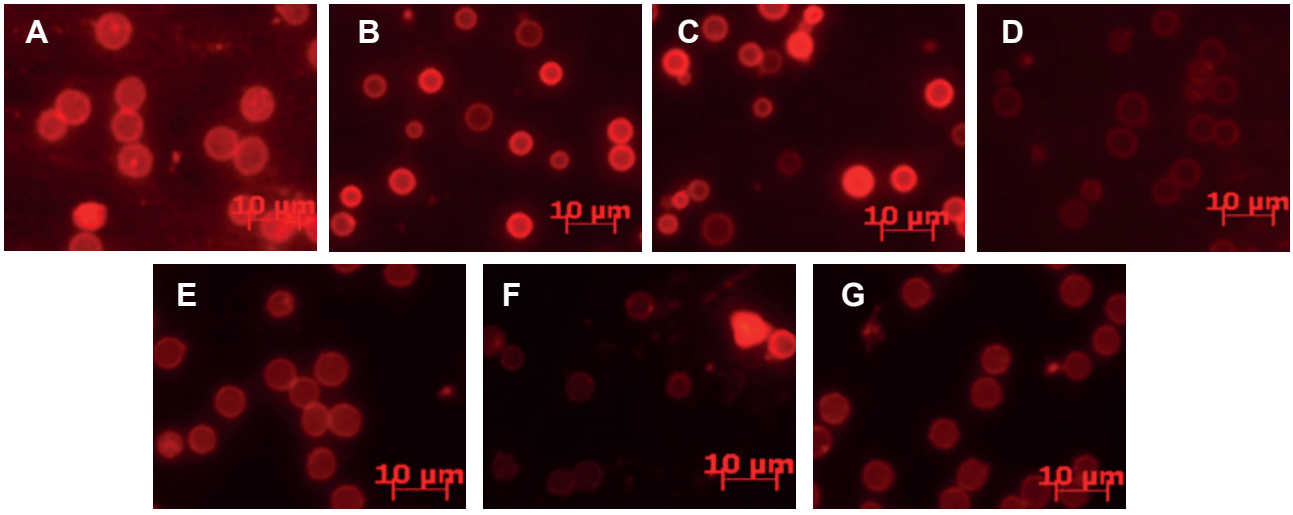

Рис. 1. Флуоресцентні зображення еритроцитів коня: **A** – контроль; **B** – після інкубації у розчині ДМСО; **C** – після заморожування-відігріву у розчині ДМСО; **D** – після заморожування-відігріву у розчині ДМСО і відмивання; **E** – після інкубації у розчині ДМСО і ПЕО-1500; **F** – після заморожування-відігріву у розчині ДМСО і ПЕО-1500; **G** – після заморожування-відігріву у розчині ДМСО і ПЕО-1500 та відмивання.

Fig. 1. Fluorescent images of equine red blood cells: **A** – control; **B** – after incubation in DMSO solution; **C** – after freezing-warming in DMSO solution; **D** – after freezing-warming in DMSO solution and washing; **E** – after incubation in DMSO and PEO-1500 solution; **F** – after freezing-warming in DMSO and PEO-1500 solution; **G** – after freezing-warming in DMSO and PEO-1500 solution and washing.

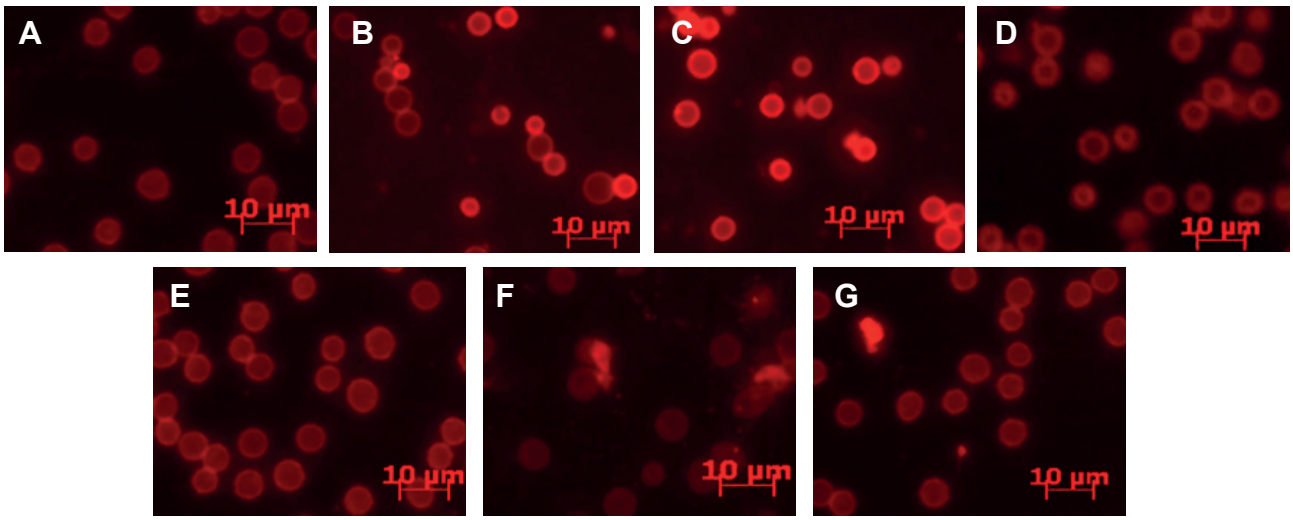

Рис. 2. Флуоресцентні зображення еритроцитів бика: **A** – контроль, **B** – після інкубації у розчині ДМСО; **C** – після заморожування-відігріву у розчині ДМСО; **D** – після заморожування-відігріву у розчині ДМСО і відмивання; **E** – після інкубації у розчині ДМСО і ПЕО-1500; **F** – після заморожування-відігріву у розчині ДМСО і ПЕО-1500; **G** – після заморожування-відігріву у розчині ДМСО і ПЕО-1500 та відмивання.

Fig. 2. Fluorescent images of equine red blood cells: **A** – control; **B** – after incubation in DMSO solution; **C** – after freezing-warming in DMSO solution; **D** – after freezing-warming in DMSO solution and washing; **E** – after incubation in DMSO and PEO-1500 solution; **F** – after freezing-warming in DMSO and PEO-1500 solution; **G** – after freezing-warming in DMSO and PEO-1500 solution and washing.

сферичної, та збільшенням проникності мембран частини клітин для барвника. Кількість гідрофобних місць зв'язування збільшується і, оскільки барвник 3-DAB взаємодіє з біологічними структурами саме за гідрофобним механізмом, суттєво посилюється флуоресценція еритроцитів. Такий ефект І.А. Буряк та співавт. [1] спостерігали за часткового пошкодження мембран, при цьому повне пошкодження клітин приводило до гасіння флуоресценції водою.

Заморожування-відігрів еритроцитів коня і бика у однокомпонентному середовищі викликає появу еритроцитів із однорідним яскравим забарвленням (рис. 1, 2). Імовірно, збільшення проникності мембрани внаслідок її пошкодження призводить до більш яскравого забарвлення клітин. Після всіх етапів кріоконсервування (заморожування-відігріву-відмивання) еритроцитів коня у розчині ДМСО клітин із яскравим забарвленням не спостерігалося. Можливо, вони видаляються із суспензії після відмивання від кріопротектору. Відсоток загиблих клітин на всіх етапах кріоконсервування визначали за рівнем гемолізу. На рис. 3 видно, що на етапі відмивання від кріопротектору рівень гемолізу еритроцитів зростає майже на 30% порівняно зі зразками відразу після заморожування-відігріву. Це свідчить про те, що відмиті клітини, які були частково пошкоджені на етапі інкубації з кріопротектором і заморожування-відігріву, повністю зруйнувалися.

Додавання до суспензії еритроцитів коня і бика кріозахисного середовища, що містить сполуки

Freezing-thawing of equine and bovine erythrocytes in a single-component medium causes the appearance of erythrocytes with a homogeneous bright color (Fig. 1, 2). Probably, increasing the permeability of membrane during its damage leads to a more vivid staining of cells. After all the stages of cryopreservation (freezing-warming-washing) of equine erythrocytes in DMSO solution no cells with a bright fluorescence were observed. They may be removed from the suspension after cryoprotectant washing. Percentage of dead cells at all the stages of cryopreservation was determined using the level of hemolysis. Fig. 3 shows that at the stage of washing from the cryoprotectant, the level of hemolysis of erythrocytes increases by almost 30% if compared to that in the samples immediately after freezing-warming. This suggests that after washing-out the cells, which were partially damaged at the stage of incubation with cryoprotectant and freezing-warming, were completely destroyed.

Adding to the suspension of equine and bovine erythrocytes of cryoprotective medium containing compounds of different type of action (DMSO and PEO-1500) did not substantially enhance the fluorescence of erythrocyte membranes, in contrast to a single-component solution based on DMSO. This indicates a less membranotropic effect of the combined medium if compared to a single-component one based on DMSO. After all the stages of cryopreservation in the combined medium, the erythrocyte sizes and intensity of the fluorescence of membranes did not differ significantly from the control (see Fig. 1, 2).

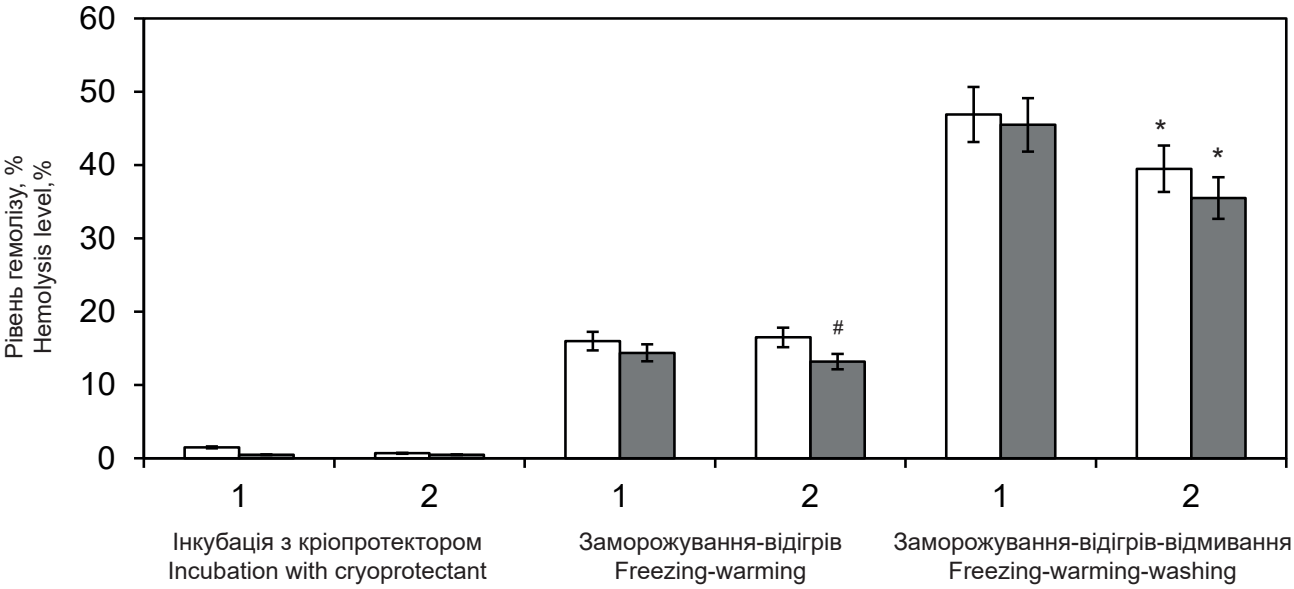

Рис. 3. Рівень гемолізу на різних етапах кріоконсервування еритроцитів коня (□) та бика (■) у середовищі з ДМСО і комбінованому середовищі з ДМСО і ПЕО-1500; * – статистично значуща різниця по відношенню до однокомпонентного середовища з ДМСО, # – статистично значуща різниця по відношенню до еритроцитів коня, $p < 0,05$ ($n = 5$).

Fig. 3. Hemolysis level at different stages of cryopreservation of equine (□) and bovine (■) red blood cells in medium with DMSO (1) and combined with DMSO and PEO-1500 (2); * – statistically significant difference with respect to single-component medium with DMSO, # – statistically significant difference as for equine red blood cells, $p < 0.05$ ($n = 5$).

різного типу дії (ДМСО і ПЕО-1500), істотно не посилювало флуоресценцію еритроцитарних мембран, на відміну від однокомпонентного розчину на основі ДМСО. Це свідчить про меншу мембранотропну дію комбінованого середовища порівняно з однокомпонентним середовищем на основі ДМСО. Після всіх етапів кріоконсервування у комбінованому середовищі за розмірами та інтенсивністю флуоресценції мембран еритроцити суттєво не відрізнялися від контрольної групи (див. рис. 1, 2).

На цитограмах флуоресцентних зображень видно, що після заморожування-відігріву значуще збільшується кількість еритроцитів у регіоні R1, а за присутності комбінованого кріозахисного середовища ці зміни виражені менше (рис. 4, 5). Так, у регіоні R1 після заморожування в розчині ДМСО спостерігається 10,5% клітин, а у комбінованому розчині – тільки 1,6%. Розподіл відмитих після кріоконсервування еритроцитів коня і бика в комбінованому середовищі близький до контролю, а розподіл еритроцитів коня, кріоконсервованих із ДМСО, зміщений вправо.

Відомо, що на розподіл клітин на цитограмі впливають морфологічні зміни еритроцитів [20]. Так, Н.Г. Землянских та співавт. [5] за даними мікроскопічних спостережень і аналізу цитограм виявили кореляцію між зсувом розподілення клітин на діаграмі вправо і збільшенням сферичності еритроцитів. Ці зміни були зворотними до моменту досягнення точки гемолізу, а після по-

The cytograms of fluorescence images that after freezing-warming, the number of erythrocytes in the region R1 increases significantly, and in the presence of a combined cryoprotective medium, these changes are less pronounced (Figs. 4, 5). Thus, in the R1 region after freezing in DMSO solution 10.5% of cells were observed, and in the combined solution only 1.6% were found. The distribution of the washed cells after cryopreservation of equine and bovine erythrocytes in the combined medium is close to the control, and the distribution of equine erythrocytes, cryopreserved with DMSO, is shifted to the right.

The distribution of cells in cytogram is known to be influenced by morphological changes of red blood cells [18]. So N.G. Zemlyanskykh *et al.* [19], according to microscopic observations and cytogram analysis, revealed the correlations between the shift of cell division in the diagram to the right and the increase of sphericity of red blood cells. These changes were reversible until the point of hemolysis was reached, and after returning to isotonic conditions, the shape of most erythrocytes and their cytogram were back to the control parameters. Based on the obtained cytometric data, we found that for the equine erythrocytes, cryopreserved with DMSO, the cytogram was not restored, even after washing-out the cryoprotectant. This fact indicates irreversible changes in the shape of erythrocytes, therefore their normal functional activity after transfusion is impossible.

Thus, it was established that single-component cryoprotective medium, based on DMSO is not quite

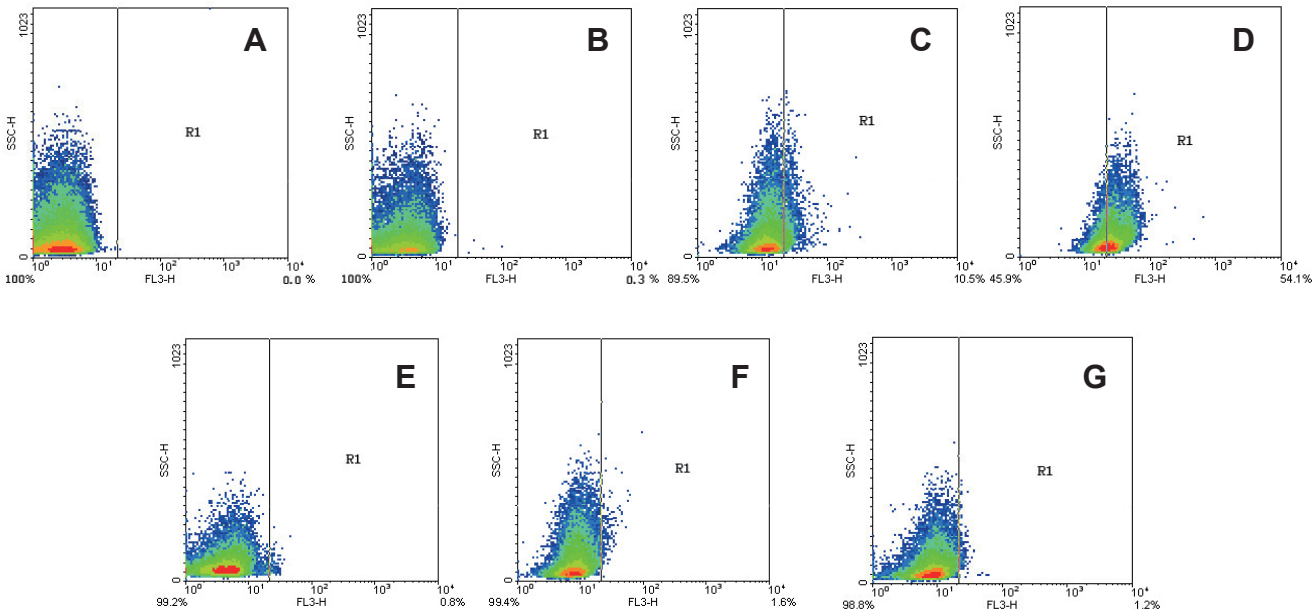

Рис. 4. Цитограми SSC/FL3-H еритроцитів коня: **A** – контроль; **B** – після інкубації у розчині ДМСО; **C** – після заморожування-відігріву у розчині ДМСО; **D** – після заморожування-відігріву у розчині ДМСО і відмивання; **E** – після інкубації у розчині ДМСО і ПЕО-1500; **F** – після заморожування-відігріву у розчині ДМСО і ПЕО-1500; **G** – після заморожування-відігріву у розчині ДМСО і ПЕО-1500 та відмивання.

Fig. 4. Cytograms of SSC/FL3-H of equine erythrocytes: **A** – control; **B** – after incubation in DMSO solution; **C** – after freezing-warming in DMSO solution; **D** – after freezing-warming in DMSO solution and washing; **E** – after incubation in DMSO and PEO-1500 solution; **F** – after freezing-warming in DMSO and PEO-1500 solution; **G** – after freezing-warming in DMSO and PEO-1500 solution and washing.

вернення до ізотонічних умов форма більшості еритроцитів та їх цитограма поверталися до контрольних показників. На підставі одержаних цитофлуориметричних даних ми встановили, що для еритроцитів коня, кріоконсервованих із ДМСО, цитограма не відновлювалася, навіть після відмивання від кріопротектора. Цей факт свідчить про незворотні зміни форми еритроцитів, а нормальна подальша функціональна їх активність після трансфузії за відсутності збереження морфологічних характеристик після кріоконсервування неможлива.

Таким чином встановлено, що однокомпонентне кріозахисне середовище на основі ДМСО недостатньо ефективне для кріоконсервування еритроцитів коня, і більшість клітин, які збереглися після заморожування, не відновлюють свої морфологічні властивості. О.М. Денисова та співавт. [3] також виявили істотні морфологічні зміни еритроцитів тварин після взаємодії з ДМСО. Еритроцити коня, бика і собаки після змішування з 20%-м розчином ДМСО (вихідна концентрація кріопротектору в розчині) набували форму неповної сфери з різною глибиною центральної ямки. Суспендування у 30%-му розчині ПЕО-1500, навпаки, призводило до сплощення еритроцитів, яке пов'язане з їх зневодненням та агрегацією. Після розморожування еритроцитів, кріоконсервованих із ДМСО, майже всі клітини

effective for cryopreservation of equine red blood cells, and most of the cells preserved after freezing did not restore their morphological characteristics. O.M. Denisova *et al.* [5] also revealed significant morphological changes in erythrocytes of animals after interaction with DMSO. Equine, bovine and dog erythrocytes after mixing with a 20% solution of DMSO (initial concentration of cryoprotectant in solution) acquired the shape of incomplete sphere with different depth of the central excavation. Suspending in a 30% solution of PEO-1500, on the contrary, led to the flattening of erythrocytes, which was associated with their dehydration and aggregation. After warming the erythrocytes, frozen with DMSO, almost all cells acquired echinocytic form, and the one with PEO-1500 had stomatocytic shape.

It was found that freezing of erythrocytes of animals in the presence of PEO-1500 allowed a low level of hemolysis [6]. Thus, for equine erythrocytes immediately after thawing, the hemolysis rate was about 1%, and after further transfusion modeling (without washing of PEO-1500) it made 25–38%. P.M. Zubov suggested [20] that the high efficiency of PEO-1500 in freezing of erythrocytes could be explained by adaptive rearrangements in them. Asymmetric distribution of phospholipids is the basis for the normal functioning of membrane and a cell as a whole. Rearrangements in lipid

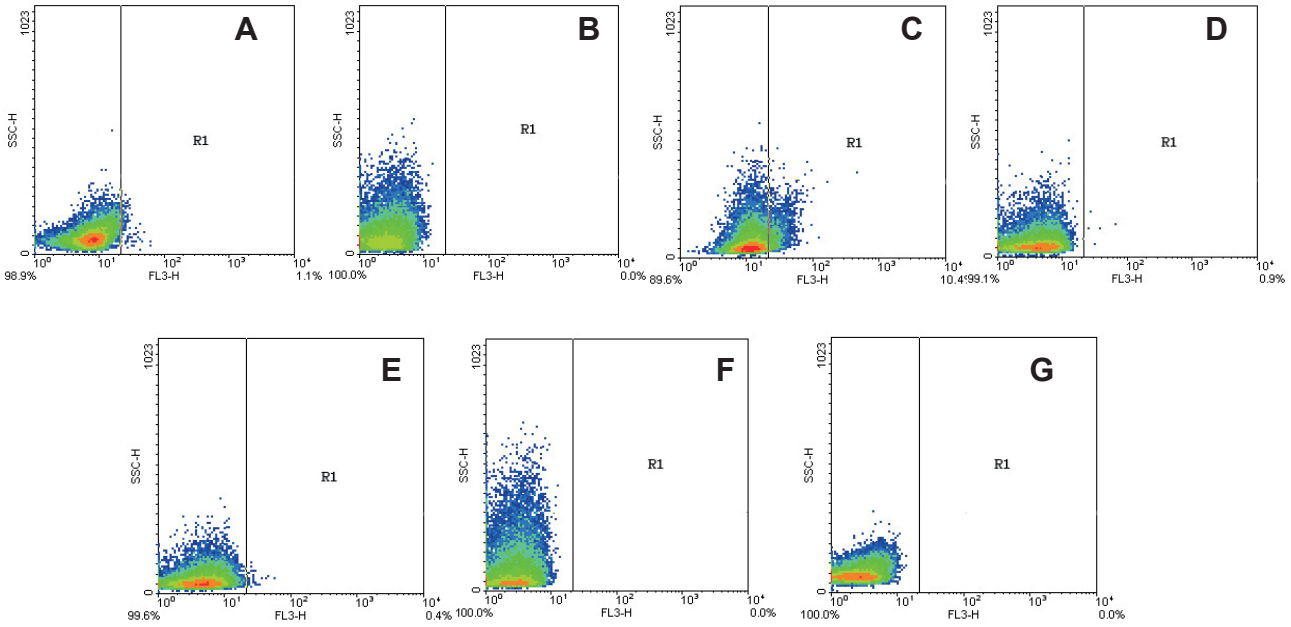

Рис. 5. Цитограми SSC/FL3-H еритроцитів бика: **A** – контроль; **B** – після інкубації у розчині ДМСО; **C** – після заморожування-відігріву у розчині ДМСО; **D** – після заморожування-відігріву у розчині ДМСО і відмивання; **E** – після інкубації у розчині ДМСО і ПЕО-1500; **F** – після заморожування-відігріву у розчині ДМСО і ПЕО-1500; **G** – після заморожування-відігріву у розчині ДМСО і ПЕО-1500 та відмивання.

Fig. 5. Cytograms of SSC / FL3-H of bovine erythrocytes: **A** – control; **B** – after incubation in DMSO solution; **C** – after freezing-warming in DMSO solution; **D** – after freezing-warming in DMSO solution and washing; **E** – after incubation in DMSO and PEO-1500 solution; **F** – after freezing-warming in DMSO and PEO-1500 solution of; **G** – after freezing-warming in DMSO and PEO-1500 solution and washing.

набували ехіноцитарної форми, а з ПЕО-1500 – стоматоцитарної.

Виявлено, що заморожування еритроцитів тварин у присутності ПЕО-1500 дозволяє отримати низький рівень гемолізу [2]. Так, для еритроцитів коня одразу після розморожування рівень гемолізу був біля 1%, а після подальшого моделювання трансфузії (без відмивання ПЕО-1500) – 25–38%. П.М. Зубовим було висловлено припущення [6], що висока ефективність ПЕО-1500 при заморожуванні еритроцитів може пояснюватися адаптивними перебудовами у них. Асиметричне розподілення фосфоліпідів є основою для нормального функціонування мембрани і клітини в цілому. Перебудови у ліпідній організації мембрани під впливом кріопротектору, а також опосередковані зміни модифікації білок-білкових і білок-ліпідних взаємодій у процесі кріоконсервування можуть порушувати асиметричне розподілення фосфоліпідів у мембрані. В еритроцитах коня виявлено дефіцит білка полоси 4.2, який відіграє важливу роль у стабілізації клітин [9]. Тому краща збереженість еритроцитів після кріоконсервування у середовищі, яке містить ПЕО-1500, може забезпечуватися модифікацією мембрано-цитоскелетного комплексу під впливом даного кріопротектору. При цьому присутність у середовищі кріоконсервування проникorganization of membrane under the influence of cryoprotectant, as well as indirect alterations of the modification of protein-protein and protein-lipid interactions in the process of cryopreservation may disrupt the asymmetric distribution of phospholipids in membrane. In equine erythrocytes the deficiency of the protein of the band 4.2 was found, which played an important role in stabilization of the cells [2]. Therefore, better preservation of erythrocytes after cryopreservation in a medium containing PEO-1500 could be provided by modification of the membrane-cytoskeleton complex under the influence of this cryoprotectant. Moreover, for equine erythrocytes the presence in cryopreservation medium of the permeable cryoprotectant DMSO can reduce the dehydration of the cells at the incubation stage and, accordingly, reduce the degree of their damage during the rehydration stage after being transferred to isotonic conditions.

It should be noted that for the washed after cryopreservation bovine erythrocytes, there was no similar to equine erythrocytes shift in the cytogram to the right and an increase in the number of cells in the R1 region (Fig. 5). This indicates the restoration of the parameters of frozen with DMSO cells after cryoprotectant washing-out. O.M. Denisova *et al.* [6] also obtained data on a higher level of hemolysis of equine erythrocytes after cryopreservation with 10%

ного кріопротектору ДМСО дозволяє зменшити зневоднення еритроцитів коня на етапі інкубації і, відповідно, знизити ступінь їх пошкодження на етапі регідратації після перенесення в ізотонічні умови.

Слід відзначити, що для відмитих після кріоконсервування еритроцитів бика не спостерігалися подібне для еритроцитів коня зміщення на цитограмі вправо і збільшення кількості клітин у регіоні R1 (рис. 5). Це свідчить про відновлення параметрів заморожених із ДМСО клітин після відмивання від кріопротектора. О.М. Денисовою та співавт. [2] також отримано дані про вищий рівень гемолізу еритроцитів коня після кріоконсервування з 10%-м ДМСО, ніж у еритроцитах бика і собаки. Після кріоконсервування з ПЕО-1500 гемоліз у еритроцитах коня був, навпаки, менший, що є доказом їх чутливості до специфічної токсичної дії ДМСО. Ми зареєстрували значуще вищий рівень гемолізу у присутності ДМСО для еритроцитів коня порівняно з еритроцитами бика (див. рис. 3). У комбінованому середовищі такої різниці виявлено не було.

B.P. Best показав [10], що ДМСО у концентрації 10% чинить токсичну дію на ряд клітин: призводить до змін у мембранах фібробластів хом'яка, викликає незворотні ультраструктурні пошкодження міокарда щурів, знижує клоногенний потенціал клітин-попередників периферичної крові тощо. Причому крім осмотичних ефектів наявна пряма блокувальна дія молекул ДМСО на білки мембранних каналів, а його гідрофільність та здатність до дестабілізації конформації білка збільшуються з підвищенням температури. Крім цього, для ДМСО характерна специфічна пошкоджуюча дія – клітинна мембранна токсичність [10]. Однак незважаючи на це, ДМСО широко застосовується для кріоконсервування багатьох біологічних об'єктів завдяки високій проникної та склоутворюючій здатності. Модифікація структури води молекулами ДМСО, яка приводить до схильності рідини до переохолодження і утворення склоподібної фази, пов'язана з тим, що час існування водневого зв'язку ДМСО-вода у кілька разів більший, ніж водневого зв'язку вода-вода. Водневі зв'язки сульфінільної групи ДМСО з водою більш сильні (близько 30 кДж/моль), ніж водневі зв'язки між молекулами води (близько 20 кДж/моль). Зв'язки ДМСО з водою стають більш слабкими з підвищенням температури [8].

Зниження токсичної дії ДМСО можливе при зменшенні його концентрації, часу та температури інкубації. Комбінація ДМСО з кріопротекторами іншого типу дії дозволяє знизити його концентрацію у розчині і відповідно зменшити токDMSO than in those of a bull and dog. After cryopreservation with PEO-1500 the hemolysis in equine erythrocytes was, in contrast, smaller, that evidenced to their sensitivity to specific toxic effects of DMSO. We recorded a significantly higher hemolysis level in the presence of DMSO for equine erythrocytes relative to the ones of a bull (see Fig. 3). In the combined medium this difference was not found.

B.P. Best showed [3] that DMSO at a concentration of 10% had a toxic effect on cells, *e. g.* led to changes in the membranes of hamster fibroblasts, caused irreversible ultrastructural damage to the myocardium of rats, reduced the clonogenic potential of peripheral blood precursors *etc.* Moreover, in addition to osmotic effects, there is a direct blocking effect of DMSO molecules on the proteins of the membrane channels, and its hydrophilicity and ability to destabilize the conformation of the protein increase with a rise in temperature. In addition, DMSO is also characterized with a specific damaging effect, *i. e.* cell membrane toxicity [3]. However, despite this, DMSO is widely used in cryopreservation of many biological objects due to high permeability and vitrifying ability. Modification of water structure with DMSO molecules, which leads to the tendency of liquid overcooling and formation of the vitrification phase, is due to the fact that the time of existence of hydrogen bond DMSO-water is several times longer than that of the hydrogen bond water-water. The hydrogen bonds of the sulfinyl group of DMSO with water are stronger (about 30 kJ/mol) than the hydrogen bonds between water molecules (about 20 kJ/mol). With temperature increase the interaction of DMSO with water becomes weaker [1].

Reducing the toxic effect of DMSO is possible by decreasing its concentration, time and incubation temperature. A combination of DMSO with other type of cryoprotectants can reduce its concentration in the solution and, accordingly, diminish the toxic effect. In this case, the total concentration of cryoprotective compounds is maintained, sufficient for modifying the water structure during freezing [8].

3-DAB stains membranes of equine and bovine erythrocytes, that allows to observe the changes in the state of cells at different stages of cryopreservation. It has been established that due to the damaging factors of the cryopreservation of the membrane, the part of the erythrocytes acquires a loose structure, and the number of hydrophobic sites of the probe binding increases, which causes the strengthening of fluorescence of the cells with damaged membranes. This fact is due to the pos-

сичну дію. При цьому зберігається сумарна концентрація кріозахисних сполук, достатня для модифікації структури води під час заморожування [11].

Таким чином, 3-DAB забарвлює мембрани еритроцитів коня і бика, що дозволяє спостерігати зміни в стані клітин на різних етапах кріоконсервування. Встановлено, що внаслідок дії пошкоджуючих факторів кріоконсервування мембрани частини еритроцитів набувають більш пухкої структури, і кількість гідрофобних місць зв'язування зонда збільшується, що викликає посилення флуоресценції клітин із пошкодженими мембранами. Цим фактом обумовлена можливість застосування флуоресцентного барвника 3-DAB для оцінки стану еритроцитів тварин після кріоконсервування з використанням проточно-цитофлуориметричного аналізу та флуоресцентної мікроскопії. Показано, що у процесі консервування еритроцитів коня і бика у комбінованому кріозахисному середовищі, на відміну від однокомпонентного середовища з ДМСО, зменшується кількість загиблих клітин; характеристики еритроцитів, які збереглися після всіх етапів кріоконсервування, більш близькі до контрольних, що важливо враховувати для клітин коня, які найбільш чутливі до пошкоджуючої дії факторів.

Висновки

1. Барвник 3-DAB можна успішно застосовувати для оцінки збереженості еритроцитів після кріоконсервування.

2. Комбіноване кріозахисне середовище з ПЕО-1500 і ДМСО більш ефективно захищає еритроцити коня і бика на всіх етапах кріоконсервування, ніж однокомпонентне середовище на основі ДМСО.

3. Еритроцити коня більш чутливі до пошкоджуючої дії факторів кріоконсервування, ніж еритроцити бика.

Література

1. Буряк ИА, Зинченко ВД, Дюбко ТС, и др. Применение новых флуоресцентных красителей в криобиологических исследованиях. Проблемы криобиологии. 2008; 18(1): 17–21.
2. Денисова ОН, Жегунов ГФ, Бабийчук ЛА. Криоконсервирование эритроцитов животных под защитой диметилсульфоксида, полиэтиленоксида, глицерина. Проблемы криобиологии. 2005; 15(2): 195–201.
3. Денисова ОН, Кулешова ЛГ, Землянских НГ, и др. Морфологические изменения эритроцитов животных после криоконсервирования. Проблемы криобиологии. 2007; 17(2): 150–5.
4. Єгоров МІ, Дюбко ТС, Ліннік ТП, та ін. Нові флуоресцентні барвники як зонди для дослідження сперматозоїдів собак

sibility of using 3-DAB fluorescent dye to evaluate the state of erythrocytes of animals after cryopreservation by means of cytometric analysis and fluorescence microscopy. It is shown that in the process of preservation of equine and bovine erythrocytes in a combined cryoprotective medium, in contrast to the single-component medium with DMSO, the number of dead cells decreases; the characteristics of erythrocytes that have survived after all stages of freeze-thawing are closer to controls, which is important to be considered for equine cells, which are most sensitive to damaging effects of factors.

Conclusions

1. The 3-DAB dye can be successfully applied to evaluate the survival rate of erythrocytes after cryopreservation.

2. Combined cryoprotective medium with PEO-1500 and DMSO more effectively protects the equine and bovine red blood cells at all the stages of cryopreservation if compared with the single-component medium based on DMSO.

3. Erythrocytes of the horse are more susceptible to the damaging effects of cryopreservation factors than the ones of bull.

References

1. Anchordoguy TJ, Carpenter JF, Crowe JH, et al. Temperature-dependent perturbation of phospholipids-bilayers by dimethylsulfoxide. Biochim Biophys Acta. 1992; 1104(1): 117–22.
2. Baskurt OK, Farley RA, Meiselman HJ. Erythrocyte aggregation tendency and cellular properties in horse, human, and rat: a comparative study. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 1997; 273(6):H2604–H2612. [Cited 01.07.2019] Available from: https://www.physiology.org/journal/ajpheart
3. Best BP. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. Rejuvenation Research. 2015; 18(5):422–36. [Cited 01.07.2019] Available from: https://www.liebertpub.com/loi/rej
4. Buriak IA, Zinchenko VD, Dyubko TS, et al. Application of new fluorescent dyes in cryobiological studies. Problems of Cryobiology. 2008; 18(1): 17–21.
5. Denisova ON, Kuleshova LG, Zemlyanskikh NG, et al. Post-thaw morphological changes in animal erythrocytes. Problems of Cryobiology. 2007; 17(2): 150–5.
6. Denisova ON, Zhegunov GF, Babijchuk LA. Cryopreservation of animal's erythrocytes under dimethyl sulfoxide, polyethylene oxide and glycerol protection. Problems of Cryobiology. 2005; 15(2): 195–201.
7. Egorov MI, Dyubko TS, Linnik TP, et al. New fluorescent dyes as fluorescent probes for examination of canine spermatozoa in cryoprotective media. Problems of Cryobiology. 2006. 16(1): 13–23.
8. Elliott GD, Wang S, Fuller BJ. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. Cryobiology. 2017; 76:74–91.

у кріозахисних середовищах. Проблемы криобиологии. 2006. 16(1): 13–23.
5. Землянских НГ, Коваленко ИФ, Бабийчук ЛА. Особенности модификации геометрических параметров и изменения осмотической хрупкости эритроцитов человека под влиянием сахарозы и ПЭГ-1500. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2017; 27(4): 296–310.
6. Зубов ПМ. Изменение липидной асимметрии мембран эритроцитов кордовой и донорской крови при криоконсервировании с ПЭО-1500. Вісник проблем кріобіології і медицини. 2013; 2(2): 109–12.
7. Улизко ПЮ, Боброва ЕН, Жегунов ГФ, и др. Влияние смесей криопротекторов на сохранность криоконсервированных эритроцитов млекопитающих. Вісник проблем біології і медицини. 2011; 3(3): 26–9.
8. Anchordoguy TJ, Carpenter JF, Crowe JH, et al. Temperature-dependent perturbation of phospholipids-bilayers by dimethylsulfoxide. BiochimBiophysActa. 1992; 1104(1): 117–22.
9. Baskurt OK, Farley RA, Meiselman HJ. Erythrocyte aggregation tendency and cellular properties in horse, human, and rat: a comparative study. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 1997; 273(6):H2604–H2612. [Cited 01.07.2019] Available from: https://www.physiology.org/journal/ajpheart
10. Best BP. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. Rejuvenation Research. 2015; 18(5):422–36. [Cited 01.07.2019] Available from: https://www.liebertpub.com/loi/rej
11. Elliott GD, Wang S, Fuller BJ. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. Cryobiology. 2017; 76:74–91.
12. Holowaychuk MK, Yagi K. Evolution of veterinary transfusion medicine and blood banking. Manual of Veterinary Transfusion Medicine and Blood Banking. 2016 1:1–12.
13. Mair T, Divers T. Equine internal medicine. Veterinary Self-Assessment Color Review Series. Boca Raton: CRC Press; 2015. 399 p.
14. Keeble E, Meredith A, Richardson J, editors. Rabbit medicine and surgery. Veterinary Self-Assessment Color Review Series. Boca Raton: CRC Press, 2016. 243 p.
15. Pogozhykh D, Pakhomova Y, Pervushina O, et al. Exploring the possibility of cryopreservation of feline and canine erythrocytes by rapid freezing with penetrating and non-penetrating cryoprotectants. Stieger K, editor. PLOS ONE. 2017; 12(1): e0169689. [Cited 08.08.2019] Available from: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0169689
16. Sink C. Practical transfusion medicine for the small animal practitioner. Jackson: Teton NewMedia, 2004. 110 p.
17. Ulizko PU, Bobrova OM, Nardid EO, et al. Cryopreservation of animals′ erythrocytes. In: European Research Area: Status, Problems and Prospects. Proceedings of the International Academic Congress; Sept 01–02 2016, Riga, Latvia. Riga; 2016. p. 13–5.
18. Won DI, Suh JS. Flow cytometric detection of erythrocyte osmotic fragility. Cytometry Part B: Clin Cytom. 2009;76(2):135–41.
19. Yagi K., Holowaychuk M. Manual of veterinary transfusion medicine and blood banking. Ames: Wiley-Blackwell, 2016. 382 p.
20. Yamamoto A, Saito N, Yamauchi Y, et al. Flow cytometric analysis of red blood cell osmotic fragility. Journal of Laboratory Automation. 2014; 19(5):483–7. [Cited 01.07.2019] Available from: https://journals.sagepub.com/home/jla

9. Holowaychuk MK, Yagi K. Evolution of veterinary transfusion medicine and blood banking. Manual of Veterinary Transfusion Medicine and Blood Banking. 2016 1:1–12.
10. Keeble E, Meredith A, Richardson J, editors. Rabbit medicine and surgery. Veterinary Self-Assessment Color Review Series. Boca Raton: CRC Press, 2016. 243 p.
11. Mair T, Divers T. Equine Internal Medicine. Veterinary self-assessment color review series. Boca Raton: CRC Press; 2015. 399 p.
12. Pogozhykh D, Pakhomova Y, Pervushina O, et al. Exploring the possibility of cryopreservation of feline and canine erythrocytes by rapid freezing with penetrating and non-penetrating cryoprotectants. Stieger K, editor. PLOS ONE. 2017; 12(1): e0169689. [Cited 08.08.2019] Available from: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0169689
13. Sink C. Practical Transfusion medicine for the small animal practitioner. Jackson: Teton NewMedia, 2004. 110 p.
14. Ulizko PU, Bobrova OM, Nardid EO, et al. Cryopreservation of animals′ erythrocytes. In: European Research Area: Status, Problems and Prospects. Proceedings of the International Academic Congress; Sept 01–02 2016, Riga, Latvia. Riga; 2016. p. 13–5.
15. Ulizko PY, Zhegunov GF, Bobrova OM, Zinchenko AV. Influence of mixtures of cryoprotective on safety of cryopreservation of erythrocyte of mammals. Bulletin of problems in biology and medicine. 2011; 3(3): 26–9. Russian.
16. Won DI, Suh JS. Flow cytometric detection of erythrocyte osmotic fragility. Cytometry Part B: Clin Cytom. 2009;76(2):135–41.
17. Yagi K., Holowaychuk M. Manual of veterinary transfusion medicine and blood banking. Ames: Wiley-Blackwell, 2016. 382 p.
18. Yamamoto A, Saito N, Yamauchi Y, et al. Flow cytometric analysis of red blood cell osmotic fragility. Journal of Laboratory Automation. 2014; 19(5):483–7. [Cited 01.07.2019] Available from: https://journals.sagepub.com/home/jla
19. Zemlianskykh NG, Kovalenko IF, Babijchuk LA. Peculiarities of modifications in geometric parameters and changes in osmotic fragility of human erythrocytes following their exposure in sucrose and PEG-1500 Solutions. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2017; 27(4): 296–310.
20. Zubov PM. Altered lipid asymmetry of membranes of red blood cells of cord and donor blood under Cryopreservation with PEG-1500. Bulletin of problems in biology and medicine. 2013; 2(2): 109–112. Russian.