

УДК 57.043: 547.42: 616.151.1

В.В. Рамазанов*, Є.Л. Воловельська, В.А. Бондаренко

Осмотичні характеристики еритроцитів після заморожування у модифікованих за складом кріоконсервантах

UDC 57.043: 547.42: 616.151.1

V.V. Ramazanov*, Ye.L. Volovelska, V.A. Bondarenko

Osmotic Characteristics of Erythrocytes After Freezing with Composition-Modified Cryopreservatives

Реферат: У роботі досліджували осмотичні показники еритроцитів, заморожених у модифікованих за складом середовища із гліцерином і 1,2-пропандіолом. Встановлено, що зниження концентрації гліцерину у кріоконсерванті за підвищення вмісту непронижного захисного компонента сорбітолу впливає на характеристики еритроцитів на різних етапах заморожування і гіпотермічного зберігання. Зниження концентрації 1,2-пропандіолу та NaCl за підвищення вмісту сахарози в кріоконсерванті дозволяє змінити двоетапний режим заморожування-відтавання еритроцитів на одноетапний. Представлена у роботі модифікація кріозахисного середовища дозволяє зменшити рівень пошкодження еритроцитів у процесі заморожування-відтавання-відмивання, що може попереджувати розвиток запалення в організмі у випадку трансфузії таких клітин.

Ключові слова: еритроцити, заморожування, гліцерин, 1,2-пропандіол, осмотичний стрес.

Abstract: Here, we have studied the osmotic parameters of erythrocytes frozen in the composition-modified media with glycerol and 1,2-propanediol. A decreased glycerol concentration in a cryopreservative and an increased content of impermeable protective component sorbitol were established to affect the erythrocyte characteristics at different stages of freezing and hypothermic storage. Reduction of 1,2-propanediol and NaCl concentrations when augmenting the sucrose content in cryopreservative agent enabled changing a two-stage mode of erythrocyte freeze-thawing to the single-stage one. The presented here modification of cryoprotective medium allowed to diminish the level of damage to erythrocytes during freeze-thawing-washing out, that might prevent the inflammation development in a body when transfusing these cells.

Key words: erythrocytes, freezing, glycerol, 1,2-propanediol, osmotic stress.

Трансфузія еритроцитів пацієнтам під час геморагічного шоку викликає посттрансфузійне запалення [6, 9, 14] внаслідок руйнування пошкоджених еритроцитів, звільнення іонів заліза та підвищення активних форм кисню [12]. Багаторазова трансфузія еритроцитів у результаті перевантаження організму залізом погіршує функцію підшлункової залози, печінки і серця [13].

У клінічній практиці використовуються два основних методи кріоконсервування еритроцитів у захисних середовищах з високим і низьким вмістом гліцерину [8, 10, 15]. Проте заморожені цими методами еритроцити мають недостатню стійкість після відтавання та поміщення в ізотонічне середовище [8, 10]. Навіть у здорових добровольців після аутотрансфузії значна частина клітин, підданих заморожуванню гліцериновим методом, руйнується протягом 24 годин [15].

Пошкодження еритроцитів після швидкого відтавання є результатом осмотичного шоку че-

Erythrocyte transfusion to patients during haemorrhagic shock may cause a post-transfusion inflammation [2, 6, 14] because of the destruction of damaged erythrocytes, release of iron ions and increased production of reactive oxygen species [12]. Multiple erythrocyte transfusion aggravates the functions of pancreas, liver and heart due to the iron overload in a body [13].

In clinical practice, two main methods for erythrocyte cryopreservation in protective media with high and low glycerol contents are used [5, 7, 15]. However, the erythrocytes frozen by these methods are not resistant enough after thawing and transferring into isotonic medium [5, 7]. Even in healthy volunteers, after autotransfusion, a major part of cells subjected to freezing by glycerol method is destroyed within 24 hrs [15].

Erythrocyte damage after rapid thawing is the result of osmotic stress due to the inability of excess intracellular glycerol to leave the cells quite rapidly. In addition, the very process of erythrocyte glycerolization and deglycerolization without

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

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

*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: ramazanovvikt9891@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: ramazanovvikt9891@gmail.com

Надійшла 22.07.2020

Прийнята до друку 14.12.2021

Received 22, July, 2020

Accepted 14, December, 2021

© 2022 V.V. Ramazanov, 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.

рез нездатність надлишку внутрішньоклітинного гліцерину виходити з клітин досить швидко. Крім того, сам процес гліцеролізації-дегліцеролізації еритроцитів без заморожування викликає їх пошкодження і гемоліз [5, 10], що вказує на необхідність зниження концентрації гліцерину в кріоконсерванті. Для запобігання пошкоджувальній дії підвищених концентрацій солей під час кристалізації позаклітинного розчину важливо також знижувати концентрацію NaCl у середовищі заморожування. Представлені дані літератури вказують на необхідність корекції складу кріоконсерванта для того, щоб зменшити осмотичний стрес і пошкодження мембран у процесі заморожування-відтавання-відмивання еритроцитів та послабити розвиток запалення в організмі після трансфузії [12].

Ефективним для кріоконсервування еритроцитів є середовище, яке складається з 37% 1,2-пропандіолу (1,2-ПД), 3% сахарози, 0,6% NaCl. Таке середовище забезпечує збереження повноцінності клітин після розморожування і відмивання. Однак у перші 24 години після трансфузії втрата еритроцитів у кров'яному руслі становить 18% [2]. Такий рівень гемолізу є меншим, ніж після трансфузії еритроцитів, кріоконсервованих із додаванням гліцерину, проте залишається все ж достатньо високим [15]. Разом з тим для заморожування еритроцитів з пропандіоль-сахаролем необхідно використовувати невисоку швидкість охолодження (12–14 град/хв) до температури $-150...-170^{\circ}\text{C}$, яку забезпечує контейнер у металевому чохла в процесі занурення і витримування клітин у рідкому азоті (-196°C) протягом 15 хв. Після заморожування контейнер витягують із чохла і переносять у рідкий азот для зберігання. Відтавання еритромаси здійснюють двоетапно: I — нагрівання зі швидкістю 5 град/хв до $-80...-110^{\circ}\text{C}$, яке забезпечується витримуванням контейнера в пінопластовому чохла протягом 20 хв; II — занурення контейнера з еритромасою у водяну баню ($42-45^{\circ}\text{C}$) на 45–60 с до повного розморожування еритроцитів [1]. Для спрощення даної технології можна скоригувати вміст компонентів кріоконсерванта пропандіоль-сахаролу. Показано, що швидке заморожування еритроцитів в ізоосмотичному сахарозо-сольовому середовищі з 1,2-ПД (7% сахарози, 0,3% NaCl, 5% 1,2-ПД) послаблює їх осмотичний стрес після швидкого відтавання [3]. Подібний склад кріоконсерванта, ймовірно, дозволить отримати заморожені еритроцити в неушкодженому стані.

Мета роботи — визначення впливу осмотичного стресу і ступеня пошкодження заморо-

жування на пошкодження еритроцитів, що спричиняє гемоліз [1, 8], thereby suggesting the need to reduce glycerol concentration in the cryopreservative. To prevent a damaging effect of increased saline concentrations during extracellular solution crystallization, it is also important to reduce the NaCl concentration in freezing medium. The reported data point at the necessity to correct the composition of cryopreservative agent in order to reduce an osmotic stress and membrane damage during erythrocyte freeze-thawing-washing out as well as to mitigate the inflammation development in the body after transfusion [12].

The medium, consisting of 37% 1,2-propanediol (1,2-PD), 3% sucrose, 0.6% NaCl is efficient for erythrocyte cryopreservation. This medium ensures an integral cell survival after freeze-thawing and washing out procedures. However, in the first 24 hrs after transfusion, the erythrocyte loss in bloodstream is 18% [9]. This level of hemolysis is lower than after transfusion of the erythrocytes cryopreserved with glycerol supplement, but remains quite a high [15]. At the same time, a low cooling rate (12–14 deg/min) down to $-150...-170^{\circ}\text{C}$ should be used for erythrocyte freezing with propanediol-saccharol, ensured by container in a metal cover during cell immersion and exposure to liquid nitrogen (-196°C) for 15 min. After freezing, the container is removed from the cover and transferred into liquid nitrogen for storage. The erythromass is then thawed in two steps: the step I includes the warming with 5 deg/min rate up to $-80...-110^{\circ}\text{C}$, that is ensured by container exposure in a foam cover for 20 min; the step II comprises the immersion of container with erythromass into a water bath ($42-45^{\circ}\text{C}$) for 45–60 s until erythrocytes are fully thawed [4]. To simplify this technique, the concentration of components of propanediol-saccharol cryopreservative may be adjusted. The rapid freezing of erythrocytes in the isoosmotic sucrose-saline medium with 1,2-PD (7% sucrose, 0.3% NaCl, 5% 1,2-PD) demonstrated the mitigation of their osmotic stress after rapid thawing [10]. The similar composition of the cryopreservative agent is likely to enable obtaining the frozen erythrocytes in undamaged state.

The research aim was to determine the impact of osmotic stress and the damage rate of frozen erythrocytes after using the composition-modified cryopreservatives with glycerol and 1,2-propanediol.

Materials and methods

Here, we have used the following freezing media: the medium 1 consisted of 38% glycerol,



жених еритроцитів після використання модифікованих за складом кріоконсервантів з гліцерином і 1,2-пропандіолом.

Матеріали і методи

У роботі використовували середовища для заморожування: 1 — 38% гліцерину, 2,9% сорбітолу і 0,63% NaCl; 2 — 28% гліцерину, 6,8% сорбітолу і 0,25% NaCl; 3 — 22% 1,2-ПД, 10% сахарози і 0,25% NaCl. Донорську кров II групи отримували на Харківській обласній станції переливання крові (Україна). Після видалення плазми еритроцити відмивали фізіологічним розчином (0,9% NaCl) при центрифугуванні 430 g протягом 5 хв. Гематокрит еритромаси після центрифугування становив 70–74%. Для насичення еритроцитів гліцерином або 1,2-ПД до 0,5 мл осаду крапельно додавали 0,5 мл кріоконсерванта з 2-хвилинним перемішуванням [10]. Отримані зразки об'ємом 1 мл у поліетиленових капсулах інкубували протягом 20 хв при 22–24°C, занурювали в рідкий азот (–196°C) і витримували 10 хв. Капсули після заморожування переносили на водяну баню (40°C) на 2 хв (процедура швидкого відтавання). Після відігрівання розморожені зразки центрифугували при 430 g протягом 5 хв, надосадову рідину видаляли, а еритроцити піддавали процедурі відмивання з використанням 6 і 0,9% NaCl [10].

Рівень вільного гемоглобіну в позаклітинному середовищі визначали спектрофотометричним методом на довжині хвилі 543 нм. Відсоток гемолізу розраховували за допомогою відношення оптичної щільності зразка до оптичної щільності зразка гемолізованого на 100 % [11].

Гіпотермічне зберігання еритроцитів (4°C) протягом 24 годин здійснювали у середовищі, яке містить 7% сахарози, 0,3% NaCl, 0,2% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, 0,1% $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$.

Осмотичний гемоліз еритроцитів досліджували в середовищі з різною концентрацією NaCl (0,09–0,9%). Клітини в середовищі об'ємом 1 мл і гематокритом 0,4% інкубували 30 хв при 20–22°C, центрифугували при 430g протягом 5 хв. Відсоток гемолізу розраховували як вказано вище за посиланням.

Кожен експеримент проводили шість разів на двох паралельних пробах. Для всіх зразків обчислювали середнє арифметичне значення і значення середньоквадратичної помилки ($M \pm m$). Для визначення статистичної значущості результатів використовували непараметричний метод Манна-Вітні при $p < 0,05$.

2.9% sorbitol and 0.63% NaCl; the medium 2 comprised 28% glycerol, 6.8% sorbitol and 0.25% NaCl; medium 3 included 22% 1,2-PD, 10% sucrose and 0.25% NaCl. Donated blood of group II (A) was procured at the Kharkiv Regional Center for Blood Services (Ukraine). After plasma removal, the erythrocytes were washed out with physiological saline (0.9% NaCl) by centrifugation at 430 g for 5 min. After centrifugation, the hematocrit of erythrocytes made 70–74%. To saturate erythrocytes either with glycerol or 1,2-PD, 0.5 ml of pellet was dropwise supplemented with 0.5 ml of cryopreservative with a 2-min mixing [7]. The obtained specimens of 1 ml volume were incubated in polyethylene capsules for 20 min at 22–24°C, then immersed into liquid nitrogen (–196°C) and kept for 10 min. After freezing, the capsules were transferred into water bath (40°C) for 2 min (rapid thawing procedure). After thawing, the specimens were centrifuged at 430 g for 5 min, followed by supernatant removal and erythrocyte washing out with 6 and 0.9% NaCl [7].

Free hemoglobin in extracellular medium was measured using spectrophotometry at 543 nm wavelength. The hemolysis percentage was calculated by the ratio of optical density of the specimen to that of the sample hemolyzed by 100% [8].

Erythrocytes were hypothermically stored (4°C) for 24 hrs in the medium containing 7% sucrose, 0.3% NaCl, 0.2% Na_2HPO_4 , $12\text{H}_2\text{O}$, 0.1% NaH_2PO_4 , $2\text{H}_2\text{O}$.

Osmotic hemolysis of erythrocytes was studied in the medium with different NaCl concentrations (0.09–0.9%). Cells in the medium of 1 ml volume and 0.4% hematocrit were incubated for 30 min at 20–22°C, and centrifuged at 430 g for 5 min. The percentage of hemolysis was calculated as indicated above by the reference.

Each experiment was performed six times in two parallel samples. For all the specimens, the mean value and the mean square error ($M \pm m$) were calculated. The Mann-Whitney U test was applied to determine the significance of the results, $p < 0.05$.

Results and discussion

The Table presents the data on erythrocyte loss at various stages of freezing and hypothermic storage (HS). A decrease in glycerol concentration from 38% [7] down to 28% with modifying the concentrations of sorbitol (from 2.9 up to 6.8%) and NaCl (from 0.63 down to 0.25%) reduced the erythrocyte hemolysis at all the cryopreservation stages and during HS. Lowering the 1,2-PD concentration down to 22% in a sucrose-saline medium, in contrast to the cryopreservative, con-



Гемоліз еритроцитів після заморожування та гіпотермічного зберігання
Erythrocyte hemolysis after freezing and hypothermic storage

Середовище заморожування Freezing medium	Цикл заморожування-відтавання, % Freeze-thawing cycle, %	Після відтавання й відмивання, % After thawing and washing out, %	Після ГЗ (24 години), % After HS (24 hrs), %
1	4,5 ± 1,0	17 ± 2,0	1,5 ± 0,2
2	2,5 ± 0,5	10 ± 1,5	1,0 ± 0,2
3	2,0 ± 0,5	5 ± 1,5	0,7 ± 0,2

Результати та обговорення

У таблиці подано дані щодо втрати еритроцитів на різних етапах заморожування і за умов гіпотермічного зберігання (ГЗ). Зменшення концентрації гліцерину з 38% [10] до 28% із модифікацією концентрації сорбітолу (з 2,9 до 6,8%) і NaCl (з 0,63 до 0,25%) знижує рівень гемолізу еритроцитів на всіх етапах кріоконсервування та у процесі ГЗ. Зменшення концентрації 1,2-ПД до 22% у сахарозо-сольовому середовищі на відміну від кріоконсерванта, який містить 37% 1,2-ПД і використовується для двоетапного режиму заморожування і відтавання [1], забезпечує зниження гемолізу порівняно з гемолізом у середовищах з додаванням гліцерину (таблиця). Рівень гемолізу еритроцитів після швидкого одноетапного заморожування з використанням кріоконсерванта, скоригованого за складом, становить 5% (таблиця) [4].

Показники гемолізу еритроцитів, заморожених у модифікованих середовищах, вказують на більшу їхню осмотичну стійкість порівняно з кріоконсервантом, який містить 38% гліцерину (таблиця). Порівняльний аналіз осмотичного гемолізу не виявив значущої різниці в осмотичній крихкості еритроцитів, заморожених у різних кріоконсервантах (рисунок).

Пошкодження еритроцитів у процесі заморожування викликане не тільки з гіпертонічним стресом внаслідок підвищення концентрації NaCl, але й з осмотичним шоком у процесі розморожування, який пов'язаний з нездатністю надлишку внутрішньоклітинного гліцерину виходити з клітин досить швидко в процесі відтавання [12]. Ймовірно, зниження концентрації гліцерину та NaCl, а також збільшення вмісту

тaining 37% 1,2-PD and used for a two-step freeze-thawing regimen [4], provided the hemolysis reduction as compared with that in glycerol-supplemented media (Table). After rapid one-step freezing using the cryopreservative with adjusted composition, the erythrocyte hemolysis made 5% (Table) [11].

Hemolysis of the erythrocytes frozen in the modified media indicated their higher osmotic resistance as compared with the cryopreservative containing 38% glycerol (Table). Comparative

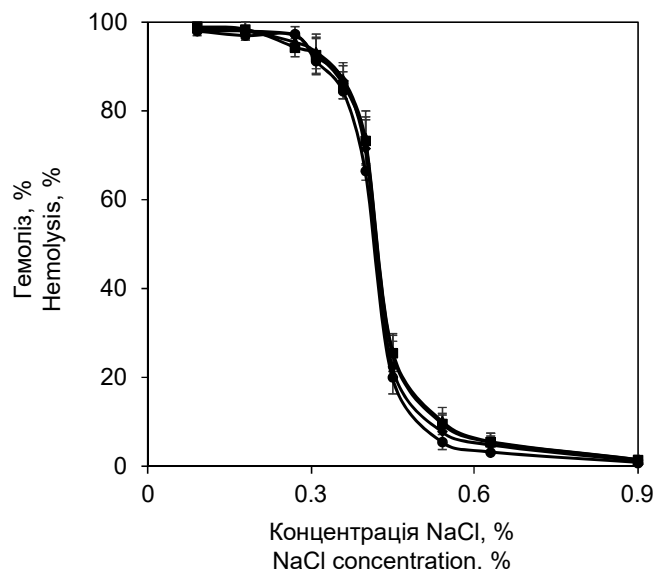


Рис. 1. Залежність гемолізу від концентрації NaCl для інтактних еритроцитів (■) та відмитих після заморожування в середовищах: ● — 1; ◆ — 2; ▲ — 3.

Fig. 1. Dependence of hemolysis on NaCl concentration for intact erythrocytes (■) and washed out ones after freezing in the following media: ● — 1; ◆ — 2; ▲ — 3.



непроникного захисного компонента сорбітолу в середовищі заморожування забезпечують осмотичну стійкість еритроцитів на етапі відтавання. Результати аналізу пошкодження клітин внаслідок заморожування-відтавання в ізоосмотичних сахарозо-сольових середовищах показали, що зниження концентрації NaCl шляхом заміщення солі сахарозою зменшує рівень гемолізу [3]. Можливо, що такий ефект обумовлено послабленням гіпертонічного сольового стресу.

Еритроцити, заморожені в середовищі з гліцерином, мають високий ступінь збереженості після відтавання лише у тому випадку, коли процедура розведення кріопротектора є повільною і компенсується додаванням сорбітолу [7]. Авторами зроблено наступний висновок: повільна швидкість, з якою гліцерин виходить з клітин, є основною причиною пошкодження клітинних мембран. Очевидно, зниження концентрації гліцерину і NaCl та підвищення концентрації сорбітолу зменшують сольовий гіпертонічний стрес у процесі заморожування еритроцитів і негативний осмотичний ефект після їх відтавання.

Рівень пошкодження еритроцитів після заморожування в середовищі з 1,2-ПД менший порівняно з середовищем, що містить гліцерин. Це пов'язано з більшою проникністю мембран для 1,2-ПД, ніж для гліцерину [4], внаслідок чого в середовищі з 1,2-ПД еритроцити після розморожування зазнають меншого осмотичного стресу. Ймовірно, це можна вважати причиною того, що після трансфузії добова втрата еритроцитів, заморожених у кріоконсерванті з 1,2-ПД, становить 18% [3], що менше ніж після трансфузії еритроцитів, заморожених гліцеринним методом (25%) [15].

Висновки

1. За умов швидкого заморожування-відтавання еритроцитів у кріоконсерванті зі зниженою концентрацією гліцерину до 28%, NaCl до 0,25% та збільшеною концентрацією сорбітолу до 6,8% зменшується їх втрата після відмивання і гіпотермічного зберігання, не змінюється осмотична крихкість та зберігається осмотична резистентність.

2. Зменшення концентрації 1,2-ПД з 37 до 22% та NaCl до 0,25% за умов підвищення вмісту сахарози до 10% дозволяє замінити двоетапну технологію заморожування-відтавання на одноетапну.

3. Встановлено, що зниження концентрації гліцерину та 1,2-ПД послаблює осмотичний стрес заморожених еритроцитів після відтавання. Крім того, така модифікація складу кріокон-

серванту аналізу осмотичного гемолізу виявив незначну різницю в осмотичній крихкості еритроцитів, заморожених різними кріопрезервативами (Figure).

Еритроцитна пошкодження під час заморожування пов'язані не тільки з гіпертонічним стресом через підвищену концентрацію NaCl, але й з осмотичним стресом під час відтавання. Крім того, осмотичний стрес пов'язаний з неможливістю надлишкового внутрішньоклітинного гліцеролу покинути клітини швидко під час відтавання [12]. Знижені концентрації гліцеролу та NaCl, а також підвищений вміст непроникного захисного компонента сорбітолу в середовищі заморожування є ймовірно гарантією осмотичної стійкості еритроцитів під час відтавання. Результати аналізу пошкодження клітин під час відтавання в ізоосмотичних сахарозо-сольових середовищах показали, що зниження концентрації NaCl шляхом заміщення солі сахарозою зменшує рівень гемолізу [3]. Можливо, що такий ефект обумовлено послабленням гіпертонічного сольового стресу.

Еритроцити, заморожені в середовищі з гліцерином, мають високий ступінь збереженості після відтавання лише у тому випадку, коли процедура розведення кріопротектора є повільною і компенсується додаванням сорбітолу [7]. Авторами зроблено наступний висновок: повільна швидкість, з якою гліцерин виходить з клітин, є основною причиною пошкодження клітинних мембран. Очевидно, зниження концентрації гліцерину і NaCl та підвищення концентрації сорбітолу зменшують сольовий гіпертонічний стрес у процесі заморожування еритроцитів і негативний осмотичний ефект після їх відтавання.

Рівень пошкодження еритроцитів після заморожування в середовищі з 1,2-ПД менший порівняно з середовищем, що містить гліцерин. Це пов'язано з більшою проникністю мембран для 1,2-ПД, ніж для гліцерину [4], внаслідок чого в середовищі з 1,2-ПД еритроцити після розморожування зазнають меншого осмотичного стресу. Ймовірно, це можна вважати причиною того, що після трансфузії добова втрата еритроцитів, заморожених у кріоконсерванті з 1,2-ПД, становить 18% [3], що менше ніж після трансфузії еритроцитів, заморожених гліцеринним методом (25%) [15].

Conclusions

1. When rapidly freeze-thaw the erythrocytes in the cryopreservative with decreased concentrations of glycerol and NaCl down to 28 and 0.25%, respectively, and an increased sorbitol concentration up to 6.8%, their loss after washing out and hypothermic storage was reduced, an osmotic fragility remained unchanged and an osmotic resistance was kept.

2. Lowering the 1,2-PD concentration from 37 down to 22% and to 0.25% for NaCl under



сервантів забезпечує менший ступінь пошкодження мембран збережених еритроцитів у процесі заморожування-відтавання-відмивання, що може зменшувати ступінь руйнування клітин після трансфузії і знижувати рівень запалення в організмі.

increasing the sucrose content up to 10% enabled replacing the two-step freeze-thawing for the single-step one.

3. Decreased glycerol and 1,2-PD concentrations were established to mitigate an osmotic stress of frozen erythrocytes after thawing. In addition, this modified composition of cryopreservatives ensured a lower damage rate to membranes of preserved erythrocytes during freeze-thawing-washing out, which could reduce the destruction rate of cells after transfusion as well as mitigate the inflammation level in the body.

Література

1. Гучок ВМ, Воротилин АМ, Луговой ВИ, Шраго МИ. Лечебная эффективность эритроцитов, криоконсервированных под защитой препарата «Пропандиосахароль». Проблемы криобиологии. 1994; (4): 44–7.
2. Пахомова ЮС, Компаниец АМ, Кулешова ЛГ. Трансформация эритроцитов на этапах криоконсервирования в криозащитных средах на основе оксиэтилированных производных глицерина со степенью полимеризации $n = 25$ и $n = 30$. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2016; 26(4): 34–60.
3. Рамазанов ВВ. Влияние комбинированных сред на повреждение эритроцитов, замороженных с различным гематокритом. Проблемы криобиологии. 2006; 16(2): 155–63.
4. Рамазанов В В, Воловельська Є Л. винахідники; Інститут проблем криобіології криомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб криоконсервування еритроцитів людини. Патент України №114838. 27.03 2017.
5. Bakhach J. The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. Organogenesis. 2009; 5(3): 119–26.
6. Bogner V, Keil L, Kanz KG, et al. Very early posttraumatic serum alterations are significantly associated to initial massive RBC substitution, injury severity, multiple organ failure and adverse clinical outcome in multiple injured patients. Eur J Med Res. 2009; 14(7): 284–91.
7. De Loecker R, Goossens W, Van Duppen V. Osmotic effects of dilution on erythrocytes after freezing and thawing in glycerol-containing buffer. Cryobiology. 1993; 30(3): 279–85.
8. Henkelman S, Noorman F, Badloe JF, Lagerberg JW. Utilization and quality of cryopreserved red blood cells in transfusion medicine. Vox Sang. 2015; 108: 103–12.
9. Hod EA, Zhang N, Sokol SA, et al. Transfusion of red blood cells after prolonged storage produces harmful effects that are mediated by iron and inflammation. Blood. 2010; 115(21): 4284–92.
10. Lelkens CC, Noorman F, Koning JG, et al. Stability after thawing of RBCs frozen with the high- and low-glycerol method. Transfusion. 2003; 43(2): 157–64.
11. Miller RH, Mazur P. Survival of frozen-thawed human red cells as a function of cooling and warming velocities. Cryobiology. 1976; 13(4): 404–14.
12. Rall W F, Mazur P, Souzu H. Physical-chemical basis of the protection of slowly frozen human erythrocytes by glycerol. Biophys J. 1978; 23(1): 101–20.
13. Spitalnik SL. Stored red blood cell transfusions: iron, inflammation, immunity, and infection. Transfusion. 2014; 54(10): 2365–71.
14. Thuret I. Post-transfusional iron overload in the haemoglobinopathies. C R Biol. 2013; 336(3): 164–72.

References

1. Bakhach J. The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. Organogenesis. 2009; 5(3): 119–26.
2. Bogner V, Keil L, Kanz KG, et al. Very early posttraumatic serum alterations are significantly associated to initial massive RBC substitution, injury severity, multiple organ failure and adverse clinical outcome in multiple injured patients. Eur J Med Res. 2009; 14(7): 284–91.
3. De Loecker R, Goossens W, Van Duppen V. Osmotic effects of dilution on erythrocytes after freezing and thawing in glycerol-containing buffer. Cryobiology. 1993; 30(3): 279–85.
4. Guchok VM, Vorotilin AM, Lougovov VI, Shrago MI. Therapeutic efficiency of RBC, cryopreserved under protection of a “Propanediosaccharole” preparation. Problems of Cryobiology. 1994; (4): 43–6.
5. Henkelman S, Noorman F, Badloe JF, Lagerberg JW. Utilization and quality of cryopreserved red blood cells in transfusion medicine. Vox Sang. 2015; 108: 103–12.
6. Hod EA, Zhang N, Sokol SA, et al. Transfusion of red blood cells after prolonged storage produces harmful effects that are mediated by iron and inflammation. Blood. 2010; 115(21): 4284–92.
7. Lelkens CC, Noorman F, Koning JG, et al. Stability after thawing of RBCs frozen with the high- and low-glycerol method. Transfusion. 2003; 43(2): 157–64.
8. Miller RH, Mazur P. Survival of frozen-thawed human red cells as a function of cooling and warming velocities. Cryobiology. 1976; 13(4): 404–14.
9. Pakhomova YuS, Kompaniets AM, Kuleshova LG. Transformation of erythrocytes during cryopreservation with oxyethylated glycerol derivatives with $n=25$ and $n=30$ polymerization degree. Probl Cryobiol Cryomed. 2016; 26(4): 349–60.
10. Ramazanov VV. Effect of combined media on damage of erythrocytes, frozen with different hematocrit values. Problems of Cryobiology. 2006; 16(2): 155–63.
11. Ramazanov VV, Volovelska Yel., inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, assignee. [The method of cryopreservation of human erythrocytes]. Patent of Ukraine №114838A. March 27 2017. Ukrainian.
12. Rall WF, Mazur P, Souzu H. Physical-chemical basis of the protection of slowly frozen human erythrocytes by glycerol. Biophys J. 1978; 23(1): 101–20.
13. Spitalnik SL. Stored red blood cell transfusions: iron, inflammation, immunity, and infection. Transfusion. 2014; 54(10): 2365–71.



15.Valeri CR, Ragno G. An approach to prevent the severe adverse events associated with transfusion of FDA-approved blood products. *Transfus Apher Sci.* 2010; 42(3): 223–33.

14.Thuret I. Post-transfusional iron overload in the haemoglobinopathies. *C R Biol.* 2013; 336(3): 164–72.

15.Valeri CR, Ragno G. An approach to prevent the severe adverse events associated with transfusion of FDA-approved blood products. *Transfus Apher Sci.* 2010; 42(3): 223–33.

