

**Толерантность клеток костного мозга к действию
осмотического стресса**

Л.В. ОСТАНКОВА, В.С. ХОЛОДНЫЙ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Tolerance of Bone Marrow Cells to Osmotic Stress Effect

OSTANKOVA L.V., KHOLODNYI V.S.

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

Изучали действие осмотического стресса в растворах хлорида натрия различной концентрации на сохранность, количественный и качественный состав, адгезивную способность и фагоцитарную активность клеток костного мозга (КМ) мыши. Установлены границы изменения осмолярности и объема клеток, которые не приводят к значительному снижению их сохранности и функциональной активности.

Вивчали дію осмотичного стресу в розчинах хлориду натрію різної концентрації на цілість, кількісний і якісний склад, адгезивну здатність і фагоцитарну активність клітин кісткового мозку миші. Установлено межі змін осмолярності і об'єму клітин, які не приводять до значного зниження їх цілості і функціональної активності.

The authors have studied the effect of osmotic stress in the solutions of sodium chloride of various concentrations on the integrity, quantitative and qualitative composition, adhesive ability and phagocyte activity of cells of mouse bone marrow (BM). There were defined the limits of changes in osmolarity and cell volume, which do not result in considerable reduction in their integrity and functional activity.

В терапии различных заболеваний все шире применяется трансплантация клеток КМ [9,10]. Для создания долговременных запасов этого трансплантационного материала единственным методом остается криоконсервирование [13, 14]. Современные методики замораживания клеток КМ предусматривают использование таких криопротекторов, как ДМСО в концентрации от 5 до 10% [13, 14]. Повреждение клеток может возникнуть на любом этапе криоконсервирования: добавление криопротектора, замораживание и оттаивание суспензии, удаление криопротектора.

Повреждения, связанные с первым и последним этапами криоконсервирования, имеют осмотическую природу и могут быть минимизированы добавлением и удалением криопротектора таким образом, чтобы пределы осмотической толерантности не были превышены. Как было отмечено в работах [6, 7], клетки КМ могут изменяться на указанных этапах в объеме от 0,5 до 2,0 от первоначальной величины в зависимости от условий добавления и удаления криопротектора.

Целью данной работы явилось изучение толерантности клеток КМ к действию осмотического стресса, возникающего при изменениях клеточного объема, которые моделировались экспозицией клеток в растворах непроникающего вещества (NaCl) различной концентрации. Изучали сохранность клеток, количественный и

In the therapy of various diseases the transplantation of BM cells has been used much more widely [9, 10]. To create the long-term stocks of this transplantation material the cryopreservation has remained single method [13, 14]. Modern methods of BM cells freezing foresee the usage of such cryoprotectants as DMSO under concentrations from 5 to 10% [13, 14]. Cell injury may appear at any stage of cryopreservation: cryoprotectant adding, freezing and thawing of suspension, cryoprotectant removing.

Damages related to the first and last stages of cryopreservation are of an osmotic origin and can be minimized by adding and removing a cryoprotectant in such a way not to exceed the limits of osmotic tolerance. As it was noted in the papers [6, 7] the BM cells can change the volume from 0.5 to 2.0 in comparison with initial volume depending on the conditions of cryoprotectant adding and removing at the mentioned stages.

The aim of this study was to investigate the tolerance of BM cells to the effect of osmotic stress, appearing during the changes in cellular volume, which were modelled with cell exposure in the solutions of non-penetrating substances (NaCl) of various concentrations. Cell integrity, their quantitative and qualitative composition, adhesive ability and phagocyte activity were studied as well.

The experiments were performed in BM cells of CBA mice, obtained from femoral bones by washing-

качественный состав и фагоцитарную активность.

Эксперименты были проведены на клетках КМ мышей линии СВА, полученных вымыванием из бедренных костей глюкозоцитратным раствором. После экспозиции в течение 5 мин в растворах хлорида натрия в концентрации 0,05; 0, 75; 0,1; 0,15; 0,3; 0,6 и 1,2 М клеточную взвесь центрифугировали, ресуспендировали в физиологическом растворе. Из полученной взвеси клеток готовили мазки, которые фиксировали метанолом и окрашивали азур-2-эозином по Романовскому-Гимза. Учет миелограмм проводили в световом микроскопе PZO [5]. Адгезивную способность оценивали по методике, описанной в [4], фагоцитарную активность – по методике [1]. Ядродержащие клетки подсчитывали в камере Горяева [5]. Сохранность клеток оценивали с использованием трипанового синего [5]. Статистическую обработку проводили по методу Стьюдента-Фишера [2].

Осмотические явления, связанные с переносом различных веществ через избирательно проницаемую мембрану клеток, вносят значительный вклад в их повреждение и криозащиту в течение всего цикла низкотемпературного консервирования [3, 8]. Уже на начальном этапе клетки переносятся, как правило, из физиологической среды в гипертоническую при изотермических условиях.

Действительная причина осмотического повреждения остается в общем неизвестной, хотя и были предложены некоторые гипотезы для объяснения этого явления [8]. Плазматическая мембрана может повреждаться в результате чрезмерного увеличения клеточного объема. Мегуман Н. [12] высказал предположение, что сжатие клетки в гипертонических условиях может также повреждать плазматическую мембрану. Steponkus P. и соавт. [1,5] показали, что потеря мембранных липидов при сжатии клетки снижает потенциал ее растяжения и лимитирует предельный объем, до которого может увеличиться клетка при регидратации. При оттаивании и переносе в изотонические условия клетки увеличиваются сверх нормального объема и могут лизировать. Mazur P. и соавт. [11] считали, что это может быть следствием повышения концентрации солей в растворе при замораживании, которое может привести к увеличению проницаемости плазматической мембраны и входу в клетку веществ, непроникающих в норме.

Проведенные исследования показали, что осмолярность среды достоверно не изменяла количественных показателей КМ ни в одном из вариантов. При сравнении влияния гипоосмолярных (100, 150 мОсм/кг) и гиперосмолярных (1200, 2400 мОсм/кг) растворов на сохранность клеток КМ наблюдали достоверное снижение их

out with glucose-citrate solution. After 5mins' exposure in the solutions of sodium chloride under concentrations of 0.05; 0.075; 0.1; 0.15; 0.3; 0.6 and 1.2 M, cellular suspension was centrifuged, re-suspended in physiological solution. The smears were prepared from the obtained cellular suspension, and then they were fixed with methanol and stained with azur-2-eosin according to Romanovsky-Gimza. The recording of myelogrammes was performed with the PZO light microscope [5]. Adhesive ability was assessed according to the method of [4], and we estimated phagocyte ability using the method [1]. Nucleated cells were calculated in Goryaev's chamber [5]. All integrity was evaluated using trypan blue staining [5]. Statistical processing was made on the method of Student-Fisher [2]. Osmotic phenomena, related to the transfer of different substances via selectively permeable membrane of cells, contribute greatly to their damage and cryoprotection during the whole cycle of low temperature preservation [3, 8]. Even at initial stage the cells as a rule are transferred from physiological medium into hypertonic under isothermic conditions.

An actual cause of osmotic damage has remained generally unknown, though there were proposed some hypotheses to explain this phenomenon [8]. Plasmatic membrane can be damaged as a result of extreme increase in cellular volume. Meryman [12] supposed that cell shrinking under hypertonic conditions can also impair plasmatic membrane. Steponkus et al. [15] showed that the loss of membrane lipids during cell shrinking reduced the potential of its extending and limited the maximum volume up to which a cell could increase during re-hydration. During thawing and transfer to isotonic conditions the cells can be increased over normal volume and be lyzed. Mazur et al. [11] believed that this can be the consequence of a rise in the concentration of salts in solution during freezing, which can lead to an increase in of the permeability of plasmatic membrane and entering to the cell of substances, non-penetrating in the norm.

Performed investigations have shown that the medium osmolarity did not change statistically true the quantitative indices of BM in any variant. When comparing hypoosmolar (100, 150 mOsm/kg) and hyperosmolar (1200, 2400 mOsm/kg) solutions on the integrity of BM cells we observed a statistically significant reduction of their number in comparison with isotonic solution (300 mOsm/kg). As for the solutions with osmolarity of 200 and 600 mOsm/kg, which approach isotonic solution, the cell integrity did not differ significantly true (Fig. 1).

When studying the cellular composition of BM in isotonic saline the ratio of erythroid-myeloid hemopoiesis lineage made 1.3:1, i.e. 47.22 ± 1.66 and 36.33 ± 3.64 , for lymphoid lineage 9.34 ± 0.66 (Fig. 2).

During cell exposure in salines with the osmolarity

количества по сравнению с изотоническим раствором (300 мОсм/кг). Что касается растворов с осмолярностью 200 и 600 мОсм/кг, которые приближаются к изотоническому раствору, сохранность клеток достоверно не отличалась (рис. 1).

При изучении клеточного состава КМ в изотоническом солевом растворе соотношение эритроидно-миелоидного ростка кроветворения составило 1,3:1, т.е. $47,22 \pm 1,66$ и $36,33 \pm 3,64\%$, лимфоидный росток - $9,34 \pm 0,66\%$ (рис. 2).

При экспозиции клеток в солевых растворах с осмолярностью 200 и 600 мОсм/кг, не было выявлено изменений показателей в эритроидном, миелоидном и лимфоцитарном ростках. Однако в некоторых пробах наблюдали тенденцию к незначительному повышению нормобластов и лимфоцитов. Соотношение эритроидно-миелоидного ростка составило 1,43:1 и 1,7:1 соответственно (рис. 2).

Как гипоосмолярные (100, 150 мОсм/кг), так и гиперосмолярные растворы (1200, 2400 мОсм/кг) снижали процентное содержание гранулоцитов миелоидного ростка (рис.2). Это приводило к увеличению соотношения эритроидно-миелоидного ростка в сторону эритроидного. В лимфоидном ростке наиболее устойчивыми были малые лимфоциты. Однако при действии гиперконцентрированного раствора (2400 мОсм/кг) их количество достоверно снижалось (рис. 2).

При воздействии на клетки КМ изотонического и близких к нему солевых растворов (200 и 600

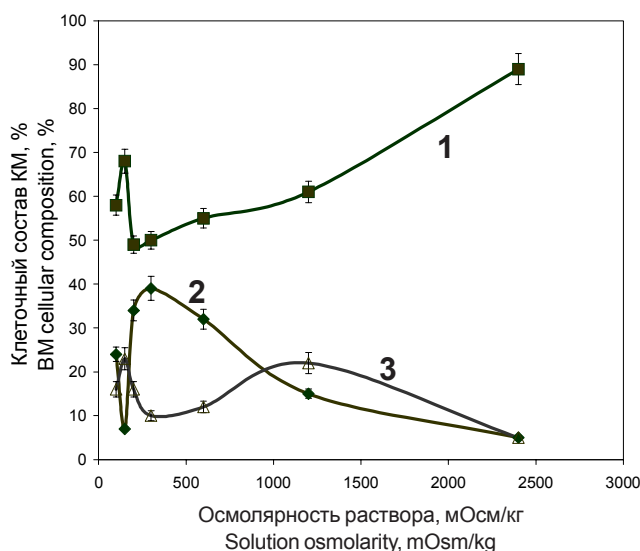


Рис. 2. Соотношение сохранившихся клеток КМ различных ростков кроветворения (1 – эритроидный, 2 – миелоидный, 3 – лимфоидный) после экспозиции клеточных суспензий в растворах хлорида натрия различной концентрации ($M \pm m$); $n=7$.

Fig. 2. Ratio of survived BM cells of various hemopoiesis lineages (1 – erythroid cells, 2 – myeloid cells, 3 – lymphoid cells) after exposure of cellular suspensions in sodium chloride solutions of various concentrations ($M \pm m$) $n=7$.

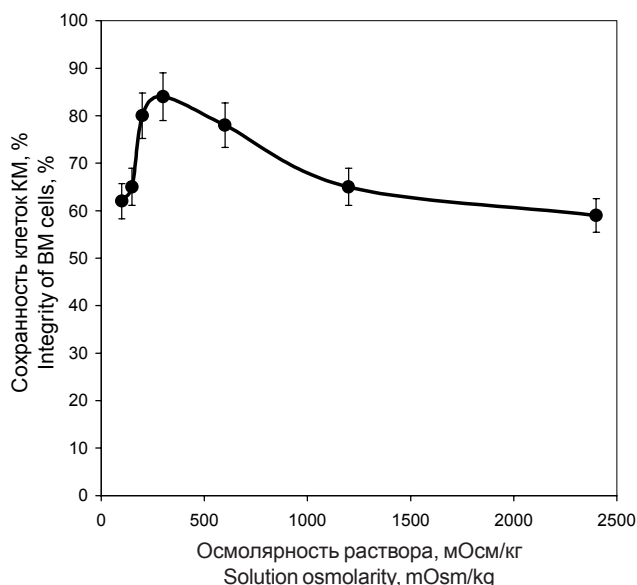


Рис. 1. Сохранность клеток КМ после экспозиции их в растворах хлорида натрия различной концентрации.

Fig. 1. Integrity of BM cells after their exposure in sodium chloride solutions of various concentrations.

of 200 and 600 mOsm/kg no changes were revealed in erythroid, myeloid and lymphoid lineages. However in some samples we observed the tendency to a slight increase in normoblasts and lymphocytes. The ratio of erythroid-myeloid lineage made 1.43:1 and 1.7:1, correspondingly (Fig.2).

Both hypoosmolar (100, 150 mOsm/kg) and hyperosmolar solutions (1200, 2400 mOsm/kg) reduced the content percentage of granulocytes of myeloid lineage (Fig. 2). This resulted in the increase of the ratio of erythroid-myeloid lineage to the side of erythroid one. In lymphoid one the most resistance were small lymphocytes. However under the effect of hyperconcentrated solution (2400 mOsm/kg) their amount statistically and significantly reduced (Fig.2). During the effect of isotonic or close to it salines (200 and 600 mOsm/kg) on BM cells no structural changes (vacuolization of nuclei and cytoplasm) were observed. Under the effect of hypo- and hyperosmolar solutions the changes in BM cell structure concerned both the nucleus and cytoplasm (mainly in granulocytes). After the effect of hyperosmolar saline the changes manifested as the vacuolization of nucleus and cytoplasm of granulocytes, as swelling and increasing the cell dimensions.

For hyperosmolar solutions, in particular with the osmolarity of 2400 mOsm/kg the damages of BM cell structure were noted in granulocytes as well. The changes meant the clasmatosis, karyorhexis, chromatin condensation, nuclei vacuolization and cytosol release out of a cell with following condensation on membrane as conglomerates of various size. The most resistant occurred to be normoblasts and lymphocytes, i.e. the cells of not large size with single mitochondria, absence

мОсм/кг) структурных изменений (вакуализации ядер и цитоплазмы) не наблюдали. При действии гипо- и гиперосмолярных растворов изменения структуры клеток КМ касались как ядра, так и цитоплазмы (в основном в гранулоцитах). После воздействия гипоосмолярного солевого раствора изменения выражались в вакуолизации ядра и цитоплазмы гранулоцитов, в набухании и увеличении размеров клеток.

Для гиперосмолярных растворов, особенно с осмолярностью 2400 мОсм/кг, повреждения структуры клеток КМ были отмечены в гранулоцитах. Изменения выражались в клазматозе, кареорексисе, конденсации хроматина, вакуолизации ядер и выходе цитозоля из клетки с последующей конденсацией на мембране в виде конгломератов разной величины. Наиболее устойчивыми оказались нормобласты и лимфоциты, т.е. клетки небольших размеров с единичными митохондриями, отсутствием лизосом и равномерным соотношением ядра и цитоплазмы.

Для исследования функциональной активности клеток КМ изучали способность клеток к адгезии и фагоцитарную активность.

Оказалось, что гиперосмолярные растворы сохраняли на высоком уровне адгезивные свойства лимфоцитов и бластов (табл.1), при воздействии гипоосмолярных растворов увеличения адгезии клеток не наблюдали, в этом случае повышалась адгезивная активность моноцитов и макрофагов.

of lysosomes and even ratio of nucleus and cytoplasm.

To investigate the functional activity of BM cells we have studied the cell ability to adhesion and phagocytes activity.

Hyperosmolar solutions occurred to be preserving at a high level the adhesive properties of lymphocytes and blasts (Table 1), under the effect of hypoosmolar solutions no increase in adhesion of the cells were observed, in this case adhesive activity of monocytes and macrophages increased. Under the effect of isotonic and close to it solutions with the osmolarity of 200 and 600 mOsm/kg there was noted a manifestation of adhesive properties of granulocytes.

These investigations allowed the determining of the fact that medium osmolarity did not change functional level of adhesion molecules in BM cells (Table 1).

When studying phagocyte activity of BM cells it has been demonstrated that despite the changes occurring in the structure of nucleus and cytoplasm of granulocytes, their functional activity (capability to phagocytosis) preserved. Phagocyte index (PhI) and phagocyte number (PhN) of granulocytes after interaction with salines of various osmolarity varied from 50 to 65%. And only under the effect of hyperosmolar solution with the osmolarity of 2400 mOsm/kg on BM cells the PhI parameters were lower 50%. PhN did not depend on osmolarity of the solution and in all cases varied within the limits of 5.5-8 absorbed by one cell microorganisms (Table 2).

The determining of granulocyte absolute number

Таблица 1. Адгезивная способность клеток КМ после экспозиции в растворах хлорида натрия различной концентрации ($M \pm m$), $n=7$.

Table 1. Adhesive ability of BM cells after cellular suspensions in sodium chloride solutions of various concentrations ($M \pm m$) $n=7$

Осмолярность раствора, мОсм/кг Solution osmolarity, mOsm/kg	Количество клеток, $\times 10^6$ Cell number, $\times 10^6$	Тип клеток Cell type									
		Бласты Blasts		Моноциты Monocytes		Лимфоидные клетки Lymphoid cells		Гранулоциты Granulocytes		Макрофаги Macrophages	
		Количество Cell number	Адгезивные, % Adhesive cells, %	Количество Cell number	Адгезивные, % Adhesive cells, %	Количество Cell number	Адгезивные, % Adhesive cells, %	Количество Cell number	Адгезивные, % Adhesive cells, %	Количество Cell number	Адгезивные, % Adhesive cells, %
100	9,63 \pm 0,65	22,60 \pm 1,58	2,18 \pm 0,15	9,75 \pm 0,68	0,94 \pm 0,07	25,35 \pm 1,77	2,44 \pm 1,71	14,08 \pm 0,99	1,42 \pm 0,99	20,43 \pm 1,43	1,97 \pm 0,14
150	9,60 \pm 0,68	20,32 \pm 1,42	1,95 \pm 0,14	14,71 \pm 1,03	1,41 \pm 0,99	39,56 \pm 2,77	3,80 \pm 0,27	13,07 \pm 0,91	1,25 \pm 0,09	12,34 \pm 0,86	1,18 \pm 0,08
200	9,65 \pm 0,69	20,84 \pm 1,46	2,01 \pm 0,14	5,57 \pm 0,39	0,54 \pm 0,04	34,12 \pm 2,39	3,29 \pm 0,23	35,51 \pm 2,49	3,43 \pm 0,24	3,98 \pm 0,28	0,38 \pm 0,03
300	9,35 \pm 0,65	26,59 \pm 1,86	2,49 \pm 0,17	6,72 \pm 0,47	0,63 \pm 0,04	16,83 \pm 1,18	1,57 \pm 0,11	35,34 \pm 2,47	3,30 \pm 0,23	14,52 \pm 1,02	1,36 \pm 0,10
600	9,50 \pm 0,64	17,51 \pm 1,23	1,66 \pm 0,12	12,01 \pm 0,84	1,14 \pm 0,08	18,50 \pm 1,30	1,75 \pm 1,30	33,0 \pm 2,31	3,14 \pm 0,22	18,98 \pm 1,33	1,80 \pm 0,13
1200	9,25 \pm 0,67	19,50 \pm 1,37	1,80 \pm 0,13	1,55 \pm 0,11	0,14 \pm 0,01	45,72 \pm 3,20	4,23 \pm 0,30	26,09 \pm 1,83	2,41 \pm 0,17	7,14 \pm 0,50	0,66 \pm 0,05
2400	9,41 \pm 0,65	28,50 \pm 1,40	2,68 \pm 0,19	6,0 \pm 0,42	0,56 \pm 0,04	51,51 \pm 0,04	4,85 \pm 0,39	10,58 \pm 0,74	0,99 \pm 0,07	3,41 \pm 0,24	0,23 \pm 0,02

Примечание. $p > 0,05$, p – вероятность случайности различий с данными для КМ в изотоническом растворе (300 мОсм/кг)

Note. $p > 0.05$, p – probability of differences with the data for BM in isotonic solution (300 mOsm/kg).

При воздействии изотонического и близких к нему растворов с осмолярностью 200 и 600 мОсм/кг отмечали проявление адгезивных свойств гранулоцитов.

Данные исследования дали возможность определить, что осмолярность среды не изменяла функциональный уровень молекул адгезии на клетках КМ (табл. 1).

При изучении фагоцитарной активности клеток КМ было показано, что, несмотря на изменения, происходящие в структуре ядра и цитоплазмы гранулоцитов, их функциональная активность (способность к фагоцитозу) сохранялась. Фагоцитарный индекс (ФИ) и фагоцитарное число (ФЧ) гранулоцитов после взаимодействия с солевыми растворами разной осмолярности варьировали от 50 до 65%. И только при воздействии гиперосмолярного раствора с осмолярностью 2400 мОсм/кг на клетки КМ показатели ФИ были ниже 50%. ФЧ не зависело от осмолярности раствора и во всех случаях колебалось в пределах 5,5-8 поглощенных одной клеткой микроорганизмов (табл. 2).

Определение абсолютного числа гранулоцитов (АЧГр) и абсолютного показателя фагоцитарной активности гранулоцитов (АПФАГр) позволило установить абсолютные показатели их сохранности и функциональной активности. Так, в изотоническом и близких к нему растворах с осмолярностью 200 и 600 мОсм/кг проявлялась способность к фагоцитозу у 30-45% гранулоцитов в 1 мкл раствора. Понижение или повышение осмолярности раствора значительно снижало эти показатели (табл. 2).

Таким образом, полученные данные позволили сделать заключение, что наименьшее влияние на количество и сохранность клеток КМ, его клеточный состав, а также адгезивную способность и фагоцитарную активность оказывают растворы с осмолярностью в диапазоне 200-600 мОсм/кг. С помощью зависимости Вант-Гоффа, полученной нами для этих клеток [7], были оценены изменения объема клеток, являющихся результатом экспозиции их в растворе непроникающего вещества: допустимые пределы изменения объема –

Таблица 2. Фагоцитарная активность клеток КМ после экспозиции в растворах хлорида натрия различной осмолярности ($M \pm m$), $n=7$

Table 2. Phagocyte activity of BM cells after exposure sodium chloride solutions of various concentrations ($M \pm m$), $n = 7$

Осмолярность раствора, мОсм/кг Solution osmolarity, mOsm/kg	Количество клеток, $\times 10^6$ Cell number, $\times 10^6$	Количество гранулоцитов, % Granulocytes number, %	ФИ PhI	ФЧ PhN	АЧГр GAN	АПФАГр GPhAAI
100	9,63 \pm 0,65	13,09 \pm 0,92	65,0 \pm 4,55	7,14 \pm 0,50	1,22 \pm 0,09	0,79 \pm 0,06
150	9,60 \pm 0,68	2,11 \pm 0,15	52,52 \pm 3,68	7,52 \pm 0,53	0,20 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01
200	9,65 \pm 0,69	1,0 \pm 0,2	53,54 \pm 3,75	6,0 \pm 0,42	0,10 \pm 0,01	0,050 \pm 0,004
300	9,35 \pm 0,65	6,12 \pm 0,43	59,57 \pm 4,17	5,46 \pm 0,38	0,59 \pm 0,41	0,35 \pm 0,02
600	9,50 \pm 0,64	5,31 \pm 0,37	56,82 \pm 3,98	7,02 \pm 0,49	0,50 \pm 0,04	0,28 \pm 0,020
1200	9,25 \pm 0,67	3,16 \pm 0,22	52,58 \pm 3,68	5,16 \pm 0,36	0,29 \pm 0,02	0,15 \pm 0,01
2400	9,41 \pm 0,65	2,45 \pm 0,17	45,16 \pm 3,16	5,02 \pm 0,35	0,23 \pm 0,02	0,10 \pm 0,01

Примечание. $p > 0,05$, p – вероятность случайности различий с данными для КМ в изотоническом растворе (300 мОсм/кг)

Note. $p > 0,05$, p – probability of differences with the data for BM in isotonic solution (300 mOsm/kg).

of granulocytes (GAN) and granulocyte phagocyte activity absolute index (GPhAAI) allowed the determining of absolute parameters of their integrity and functional activity. So, in isotonic and close to it solutions with the osmolarity of 200 and 600 mOsm/kg there was manifested the ability to phagocytosis in 30-45% of granulocytes in 1 mcl of the solution. A decrease or increase of the solution osmolarity considerably reduced these parameters (Table 2).

Thus the obtained data permitted to conclude that the least effect on the number and integrity of BM cells, its cellular composition and adhesive ability and phagocyte activity is caused by the solutions with osmolarity within the range of 200-600 mOsm/kg. Using Van't Hoff dependence obtained by us for these cells [7] we assessed the changes in cell volume, resulted from their exposure in the solution of non-penetrating substance: admissible limits of the volume changes are its reduction down to 60 and increase up to 130%. When developing the methods of exposure and washing-out of cells in cryoprotectant solutions these limits should be taken into account, because the increase or decrease of cell volume, correspondingly, higher or lower these limits may lead to the impairment of the structure and loss of functional activity of the cells, which can affect the transplant quality.

References

1. Aleksandrov M.G., Kudryavitsky A.I., Rumyantseva E.G. et al. Method of calculation of phagocytosis absolute indices // Lab. Delo. – 1988. – N9. – P. 30-32.

уменьшение до 60 и увеличение до 130%. При разработке методик экспозиции и отмычки клеток в растворах криопротекторов следует учитывать эти пределы, так как увеличение или уменьшение объема клетки соответственно выше или ниже данных лимитов может привести к нарушению структуры и потере функциональной активности клеток, что отразится на качестве трансплантата.

Литература

1. Александров М.Г., Кудрявицкий А.И., Румянцева Е.Г. и др. Метод вычисления абсолютных показателей фагоцитоза // Лаб. дело. – 1988. – № 9. – С. 30-32.
2. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. – Л.: Медицина. – 1962. – 180 с.
3. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы криоконсервирования клеточных суспензий. – Киев: Наук. думка, 1994. – 184 с.
4. Иммунология: Практикум / Е.У. Пастер, В.В. Овод, В.К. Пазур, Н.Е. Выхоть. – Киев: Вища школа, 1989. – 304 с.
5. Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. В.В.Меньшикова. – М: Медицина, 1987. – 368 с.
6. Холодный В.С., Розанов Л.Ф. Кинетика осмотических реакций ядросодержащих клеток костного мозга мыши и кордовой крови человека на этапе удаления из них проникающего криопротектора // Пробл. криобиологии. – 2002. – №3. – С. 24-29.
7. Kholodnyy V.S., Rozanov L.F. Measurement of the permeability of plasma membrane of murine bone marrow cells to water and cryoprotectants // Visn. Харк. ун-ту, №560. Біофізичний вісник. – 2002. – Вип. 1 (10). – С. 73-77.
8. Gao D., Critser J.K. Mechanisms of cryoinjury in living cells // ILAR J. – 2000. – Vol.41(4). – P. 187-196.
9. Goldman J. Bone marrow transplantation // Curr Opin Haematol. – 1995. – Vol.2. – P. 407-408.
10. Gratwohl A., Passweg J., Baldomero H., Urbano-Ispizua A. Hematopoietic stem cell transplantation activity in Europe 1999 // Bone Marrow Transplantation. – 2001. – Vol.27. – P. 899-916
11. Mazur P., Leibo S.P., Chu E.H.U. A two-factor hypothesis of freezing injury // Exp. Cell. Res. – 1972. – Vol.71. – P. 345-355.
12. Meryman H.T. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury // Cryobiology. – 1971. – Vol. 8. – P. 489-500
13. Rowley D. Hematopoietic stem cell cryopreservation: review of current techniques // J. Hematother. – 1992. – Vol.1. – 233-250.
14. Sputtek A, Korber Ch. Cryopreservation of red blood cells, platelets, lymphocytes, and stem cells / In: Fuller B.J., Grout B.W.W. (eds). Clinical Applications of Cryobiology. – Boca Raton: CRC Press, 1991. – P. 95-147.
15. Steponkus P.L., Wolfe J., Dowgert J.F. Stresses induced by contraction and expansion during a freeze-thaw cycle: a membrane perspective / In: Effects of Low Temperature on Biological Membranes. Editors: Morris G.J., Clarke A. – New York: Academic Press, 1981. – P 307-322.
2. Ashmarin I.P., Vorobyev A.A. Statistical methods in microbiological investigations. L: Meditsina. – 1962. – 180 p.
3. Gordenko E.A., Pushkar N.S. Physical grounds of cryo-preservation of cellular suspensions. Kiev: Naukova dumka, 1994. – 184 p.
4. Immunology: Practicum / Ed. E.U. Paster, V.V. Ovod, V.K. Pazur, N.E. Vyhot. Kiev: Vyschya Shkola, 1989. – 304 p.
5. Laboratory methods of investigations in clinic / Ed. by V.V. Menshikov. M: Meditsina, 1987. – 368 p.
6. Kholodnyy V.S., Rozanov L.F. Kinetics of osmotic responses of nucleated cells of mice bone marrow and human cord blood at the stage of penetrating cryoprotectant removal // Problems of Cryobiology. – 2002. – N3. – P. 24-30.
7. Kholodnyy V.S., Rozanov L.F. Measurement of the permeability of plasma membrane of murine bone marrow cells to water and cryoprotectants // Visnyk of V.N. Karazin Kharkiv National University, N560. Biophysical Bulletin. – 2002. – Вип. 1 (10). – P. 73-77.
8. Gao D., Critser J.K. Mechanisms of cryoinjury in living cells // ILAR J. – 2000. – Vol.41(4). – P. 187-196.
9. Goldman J. Bone marrow transplantation // Curr. Opin. Haematol. – 1995. – Vol.2. – P. 407-408.
10. Gratwohl A., Passweg J., Baldomero H., Urbano-Ispizua A. Hematopoietic stem cell transplantation activity in Europe 1999 // Bone Marrow Transplantation. – 2001. – Vol.27. – P. 899-916
11. Mazur P., Leibo S.P., Chu E.H.U. A two-factor hypothesis of freezing injury // Exp. Cell. Res. – 1972. – Vol.71. – P. 345-355.
12. Meryman H.T. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury // Cryobiology. – 1971. – Vol. 8. – P. 489-500
13. Rowley D. Hematopoietic stem cell cryopreservation: review of current techniques // J. Hematother. – 1992. – Vol.1. – 233-250.
14. Sputtek A, Korber Ch. Cryopreservation of red blood cells, platelets, lymphocytes, and stem cells / In: Fuller B.J., Grout B.W.W. (eds). Clinical Applications of Cryobiology. – Boca Raton: CRC Press, 1991. – P. 95-147.
15. Steponkus P.L., Wolfe J., Dowgert J.F. Stresses induced by contraction and expansion during a freeze-thaw cycle: a membrane perspective / In: Effects of Low Temperature on Biological Membranes. Editors: Morris G.J., Clarke A. – New York: Academic Press, 1981. – P 307-322.

Accepted in 24.12.2002.

Поступила 24.12.2002