

УДК 57.043:611.013:57.043

А.В. Николенко*, О.В. Вязовская, В.В. Чеканова

Криозащитная эффективность сред, содержащих комбинации оксиэтилированного метилцеллозоля и диметилацетамида при замораживании-отогреве эритроцитов человека

UDC 57.043:611.013:57.043

A.V. Nikolenko*, O.V. Vyazovska, V.V. Chekanova

Cryoprotective Efficiency of Media Combining Oxyethylated Methylcellosolve and Dimethyl Acetamide during Freeze-Thawing of Human Erythrocytes

Реферат: Перспективным направлением при разработке криозащитных сред для криоконсервирования эритроцитов является использование смеси криопротекторов, относящихся к разным классам химических соединений. В данном исследовании оценивали криозащитную активность комбинаций представителя класса полиолов – непроникающего криопротектора оксиэтилированного метилцеллозоля со степенью полимеризации $n = 33-35$ (ОЭМЦ _{$n=33-35$}) и класса амидов – проникающего криопротектора диметилацетамида (ДМАц). Комбинации ОЭМЦ _{$n=33-35$} и ДМАц в весовых соотношениях 1:1 (10 и 10%); 2:1 (10 и 5%); 3:1 (15 и 5%); 4:1 (20 и 5%); 5:1 (25 и 5%) сравнивали с 20 и 30%-ми растворами ОЭМЦ _{$n=33-35$} . Растворы добавляли к эритроцитам в соотношении 1:1 (объем/объем) при температуре 20...22°C, клеточные суспензии замораживали путем погружения в жидкий азот. Установлено, что включение ДМАц в криозащитные среды на основе ОЭМЦ _{$n=33-35$} повышало осмотическую устойчивость эритроцитов после замораживания-отогрева. Использование растворов криопротекторов ОЭМЦ _{$n=33-35$} и ДМАц в соотношении 1:1 (10 и 10%) и 3:1 (15 и 5%) обеспечивало высокую сохранность эритроцитов после замораживания-отогрева. Установлена корреляционная связь осмотической хрупкости эритроцитов с показателями внутриклеточного содержания калия и натрия после замораживания-отогрева и гематокрита на этапе экспозиции с криозащитными средами.

Ключевые слова: эритроциты, криоконсервирование, многокомпонентные криозащитные среды, оксиэтилированный метилцеллозоль, диметилацетамид.

Реферат: Перспективним напрямком при розробці криозахисних середовищ для криоконсервування еритроцитів є використання суміші криопротекторів, які належать до різних класів хімічних сполук. У цьому дослідженні оцінювали криозахисну активність комбінацій представника класу поліолів – непроникаючого криопротектора оксиетильованого метилцелозольу зі ступенем полімеризації $n = 33-35$ (ОЕМЦ _{$n=33-35$}) і класу амідів – проникаючого криопротектора диметилацетаміду (ДМАц). Комбінації ОЕМЦ _{$n=33-35$} і ДМАц у вагових співвідношеннях 1:1 (10 і 10%); 2:1 (10 і 5%); 3:1 (15 і 5%); 4:1 (20 і 5%); 5:1 (25 і 5%) порівнювали з 20 і 30%-ми розчинами ОЕМЦ _{$n=33-35$} . Розчини додавали до еритроцитів в співвідношенні 1:1 (об'єм/об'єм) при температурі 20...22°C, клітинні суспензії заморожували шляхом занурення в рідкий азот. Встановлено, що включення ДМАц у криозахисні середовища на основі ОЕМЦ _{$n=33-35$} підвищувало осмотичну стійкість еритроцитів після заморожування-відігріву. Використання розчинів криопротекторів ОЕМЦ _{$n=33-35$} і ДМАц у співвідношенні 1:1 (10 і 10%) та 3:1 (15 і 5%) забезпечувало високу збереженість еритроцитів після заморожування-відігріву. Встановлено кореляційний зв'язок осмотичної крихкості еритроцитів з показниками внутрішньоклітинного вмісту калію та натрію після заморожування-відігріву та гематокриту на етапі експозиції з криозахисними середовищами.

Ключові слова: еритроцити, криоконсервування, багатоконпонентні криозахисні середовища, оксиетильований метилцелозоль, диметилацетамід.

Abstract: Using the media, which combine cryoprotectants being chemicals of different classes, is prospective when developing cryoprotective solutions to cryopreserve erythrocytes. This investigation was performed to evaluate cryoprotective activity of media combining representative of polyols, non-penetrating cryoprotectant oxyethylated methyl cellosolve with polymerization degree of $n = 33-35$ (OEMC _{$n=33-35$}) and the representative of amides, penetrating cryoprotectant dimethyl acetamide (DMAc). Combinations of OEMC _{$n=33-35$} and DMAc in concentration (w/w) ratios 1:1 (10 and 10%); 2:1 (10 and 5%); 3:1 (15 and 5%); 4:1 (20 and 5%); 5:1 (25 and 5%) were compared with 20 and 30% OEMC _{$n=33-35$} solutions. Addition of DMAc to cryoprotective media based on OEMC _{$n=33-35$} increased the post-thaw osmotic resistance of erythrocytes. Application of the media combining OEMC _{$n=33-35$} and DMAc in ratios of 1:1 (10 and 10%) and 3:1 (15 and 5%) provided a high post-thaw survival of erythrocytes. Osmotic fragility of erythrocytes was found to correlate with the indices of intracellular content of potassium and sodium and with hematocrit value during exposure of the cells in cryoprotective media.

Key words: erythrocytes, cryopreservation, multicomponent cryoprotective media, oxyethylated methyl cellosolve, dimethyl acetamide.

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

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015;
тел.: (+38 057) 373-30-07, факс: (+38 057) 373-30-84,
электронная почта: nikolav54@rambler.ru

Поступила 23.09.2013

Принята в печать 14.10.2013

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т. 23, №4. – С. 297–308.
© 2013 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

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

* To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;
tel.: +380 57 373 3007, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: nikolav54@rambler.ru

Received September, 23, 2013

Accepted October, 14, 2013

Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2013. – Vol. 23, Nr. 4. – P. 297–308.
© 2013 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

Разработка криозащитных сред для замораживания эритроцитов на основе непроникающих криопротекторов связана с необходимостью создания безотмывочных методов, значительно упрощающих технологию криоконсервирования и практическое применение эритроцитов [12, 16].

Перспективным направлением при разработке криозащитных сред является использование смесей криопротекторов, относящихся к разным классам химических соединений. Сочетание низко- и высокомолекулярных криопротекторов с сахарами (декстраном, сахарозой, трегалозой, глюкозой) эффективно при замораживании эритроцитов, тромбоцитов, стволовых клеток [15, 20, 21, 23–25]. Выраженную криозащитную эффективность проявили смеси амидов и полиолов, поскольку по ряду физико-химических свойств они дополняют друг друга; комбинирование сред на основе представителей этих классов позволило снизить концентрацию каждого из криопротекторов и уменьшить токсичность среды [9]. Криозащитное действие амидов связывают с их способностью быстро проникать через клеточную мембрану и взаимодействовать как с липидными компонентами мембран, так и с молекулами воды, что является следствием биполярной структуры амидов и относительно малых размеров их молекул [3, 8, 13]. Установлено, что в присутствии амидов замедляется скорость роста кристаллов льда и существенно снижается скорость укрупнения кристаллов в процессе рекристаллизации [13]. Амиды были испытаны на значительном количестве биологических объектов, в том числе на эритроцитах и тромбоцитах человека, но практическое применение получил только диметилацетамид, который в составе криоконсерванта «Тромбокриодмац» используют для замораживания тромбоцитов человека [4, 17].

Показана эффективность комбинированных криозащитных сред, содержащих ДМАц и полиолы, при замораживании тромбоцитов [4]. Для полиолов характерна высокая гидрофильность, т. е. способность образовывать водородные связи с молекулами воды и, как следствие, обеспечивать мелкокристаллическую структуру льда. Анализ физического состояния бинарных систем вода – оксиэтилированный глицерин со степенью полимеризации $n = 25, 30$ (ОЭГ _{$n=25,30$}) и вода – оксиэтилированный метилцеллозоль со степенью полимеризации $n = 33–35$ (ОЭМЦ _{$n=33–35$}) методом дифференциальной сканирующей калориметрии показал, что исследуемые системы при замораживании проявляли способность к частичному стеклованию, если концентрация полиолов составляла 5–45% [6, 28]. Эти свойства во многом могут объяснять высокую криопротекторную активность полиолов при замо-

Development of cryoprotective media based on non-penetrating cryoprotectants is dictated by the need to create ‘no-wash’ techniques, which would simplify the process of cryopreservation and application of erythrocytes [12, 16].

Application of mixture of cryoprotectants referring to different classes of chemical compounds is a prospective direction when developing cryoprotective media. Combination of low- and high-molecular cryoprotectants with sugars (dextran, sucrose, trehalose, glucose) was effective during freezing of erythrocytes, platelets, stem cells [15, 20, 21, 23–25]. Mixtures of amides and polyols manifested the expressed cryoprotective efficiency, whereas some of their physical and chemical properties complemented each other; media combining the representatives of these classes allowed to reduce concentration of each cryoprotectant and thereby to decrease medium toxicity [9]. Cryoprotective effect of amides was associated with their ability to penetrate rapidly through cell membranes and interact with both lipid components of membranes and water molecules, that was due to bipolar structure of amides and relatively small molecules [3, 8, 13]. It was established that presence of amides reduced the rate of ice crystals growth and significantly decreased the degree of crystals aggregation during recrystallization [13]. Amides were tested in a number of biological objects, including human erythrocytes and platelets, but only dimethyl acetamide gained its practical application for freezing of human platelets as a part of ‘Thrombocryodmac’ cryopreservative [4, 17].

Efficiency of cryoprotective media combining DMAc and polyols was shown during freezing of platelets [4]. The polyols possess high hydrophilicity, *i. e.* capacity to form hydrogen bonds with water molecules and, as a result, to provide microcrystalline structure of ice. Differential scanning calorimetric analysis of physical state of binary systems water – oxyethylated glycerol with polymerization degree of $n = 25, 30$ (OEG _{$n=25,30$}) and water – oxyethylated methyl cellosolve with polymerization degree of $n = 33–35$ (OEMC _{$n=33–35$}) showed that the studied systems were able to partial vitrification, if the concentration of polyols was 5–45% [6, 28]. To a large extent, these properties could explain a high cryoprotective activity of polyols when freezing blood cells [7, 12].

Oxyethyl derivatives of polyols (*e. g.* of glycerol and ethylene glycol) are of special attention, as they are high-molecular non-penetrating substances, which could be the base for effective cryoprotective media developed to freeze blood cells [1, 12]. Principally, the effect of high-molecular cryoprotectants is associated with cell dehydration [2]. On one hand, providing of water efflux from a cell decreases the possibility of intracellular crystallization when freezing; on another,



раживании клеток крови [7, 12]. Оксиэтильные производные полиолов (глицерина и этиленгликоля) заслуживают особого внимания, поскольку они представляют собой высокомолекулярные непроницающие вещества, на основе которых возможна разработка эффективных криозащитных сред для замораживания клеток крови [1, 12]. Одним из механизмов действия высокомолекулярных криопротекторов является дегидратация клеток [2]. С одной стороны, выход воды из клетки снижает вероятность внутриклеточной кристаллизации при замораживании, с другой, чрезмерное обезвоживание клеток приводит к повышению осмолярности внутриклеточной среды, что может стать причиной повреждения различных клеточных структур и нарушения барьерной функции плазматической мембраны. Поэтому одной из задач при создании криозащитных сред на основе непроницающих криопротекторов является уменьшение негативного влияния дегидратации клеток, что может быть достигнуто включением в состав сред консервирования различных добавок, в том числе проникающих криопротекторов. Присутствие проникающих криопротекторов в составе таких криозащитных сред может также снижать повреждающее действие внутриклеточного льда на этапе замораживания-отогрева.

Оксиэтилированный метилцеллозольв (ОЭМЦ) как непроницающий криопротектор был использован ранее при замораживании эритроцитов кордовой и донорской крови человека [12, 16]. Исследование криозащитных свойств сред на основе ОЭМЦ при замораживании эритроцитов донорской крови человека показало, что введение в состав сред углеводов приводило к снижению степени дегидратации клеток на этапе экспозиции в криозащитных средах и в итоге способствовало повышению сохранности эритроцитов [22].

Целью представленной работы являлось исследование эффективности криозащитных сред, содержащих комбинации оксиэтилированного метилцеллозольва и диметилацетамида в разных соотношениях при замораживании-отогреве эритроцитов человека.

Материалы и методы

Эритромассу получали методом центрифугирования (930g, 15 мин) донорской крови человека ($n = 9$), заготовленной на гемоконсерванте «Глюгидир» и хранившейся не более 2-х суток в холодильнике (3°C). Гематокрит полученной эритромассы составлял в среднем 70%.

В работе использовали многокомпонентные среды, содержащие ОЭМЦ _{$n=33-35$} и ДМАц в сле-

excessive cell dehydration results in rising intracellular environment osmolarity that may result in damage of cell components and impairment of plasma membrane barrier properties. That is why one of the objectives during development of cryoprotective media is to minimize the negative effect of dehydration that could be reached by introducing several supplements to preserving media, penetrating cryoprotectants in particular. Presence of penetrating cryoprotectants in such a cryoprotective media could also contribute to a decrease of damaging effect exhibited by intracellular ice during freeze-thawing.

Oxyethylated methyl cellosolve (OEMC) was used as non-penetrating cryoprotectant during freezing of erythrocytes of human cord blood and adult donor blood [12, 16]. Investigation of cryoprotective properties of the media based on OEMC during freezing of erythrocytes of human adult donor blood showed that supplementation of cryoprotective media with carbohydrates allowed to decrease cell dehydration extent during exposure in cryoprotective media and finally to elevate erythrocyte post-thaw survival [22].

The research aim was to study the efficiency of cryoprotective media containing combinations of oxyethylated methyl cellosolve and dimethyl acetamide in different ratios during freeze-thawing of human erythrocytes.

Materials and methods

Erythromass was procured by centrifugation (930g, 15 min) from human adult donor blood ($n = 9$) stored in Glugicyr preservative not longer than for 2 days in a fridge (3°C). Average hematocrit of resulted erythromass was 70%.

The experiments were conducted in multicomponent media with following combinations of cryoprotectants OEMC _{$n=33-35$} and DMAc, correspondingly: 1:1 (10 and 10%, hereinafter we use % w/w); 2:1 (10 and 5%); 3:1 (15 and 5%); 4:1 (20 and 5%); 5:1 (25 and 5%). Cryoprotective efficiency of the studied media was compared with 'reference' solutions of 20 and 30% OEMC _{$n=33-35$} . All the media were prepared with 150 mmol NaCl solution. Erythromass specimens were supplemented with the studied solutions in 1:1 ratio (v/v) at 20...22°C. Exposure duration was 45 min. Thereafter the erythrocyte suspension in cryoprotective media was placed into 2 ml plastic vials (Russia) and frozen by plunging into liquid nitrogen. The frozen samples of erythrocytes were stored at the liquid nitrogen temperature during 2 months and warmed in water bath at 40...42°C for 1 min.

Cryoprotective properties of the media were assessed by the indices, characterizing erythrocyte post-thaw survival such as hemolysis (percentage of hemolysed



дующих концентрационных соотношениях: 1:1 (10 и 10 %, здесь и далее указаны % масс.); 2:1 (10 и 5%), 3:1 (15 и 5%); 4:1 (20 и 5%); 5:1 (25 и 5%). Криозащитную эффективность указанных сред сравнивали с «базовыми» растворами 20 и 30% ОЭМЦ_{n=33-35}. Все среды готовили на растворе 150 ммоль NaCl. Исследуемые среды добавляли к эритроmasсе в соотношении 1:1 (объем/объем) при температуре 20...22°C. Продолжительность экспозиции составляла 45 мин. Затем взвесь эритроцитов с криозащитными средами помещали в полиэтиленовые ампулы (Россия) вместимостью 2 мл и замораживали погружением в жидкий азот. Замороженные образцы эритроцитов после хранения при температуре жидкого азота в течение 2-х месяцев отогревали на водяной бане при температуре 40...42°C в течение 1 мин.

Криозащитные свойства сред оценивали по показателям, характеризующим сохранность эритроцитов: гемолиз (процент разрушенных клеток после замораживания-отогрева), осмотическая хрупкость (процент разрушенных эритроцитов после замораживания-отогрева и помещения в изотонический раствор NaCl), внутриклеточное содержание ионов калия и натрия. Уровень гемолиза и осмотическую хрупкость эритроцитов после замораживания-отогрева определяли по выходу гемоглобина из клеток спектрофотометрическим методом при длине волны 540 нм и рассчитывали относительно 100%-го гемолиза [11]. Внутриклеточное содержание калия и натрия измеряли на пламенном фотометре ПАЖ-1 (СССР), для этого взвесь эритроцитов центрифугировали в течение 15 мин при 230g, отделяли надосадок, и образцы отцентрифугированной эритроmasсы объемом 150 мкл гемолизировали в дистиллированной воде. В полученном растворе, а также в надосадке определяли содержание калия и натрия [11]; приведенные в работе данные пересчитаны на 100%-й гематокрит. Исследуемые показатели оценивали до замораживания после экспозиции клеток в криозащитных средах относительно контроля – эритроmasсы в физиологическом растворе в соотношении 1:1. Показатели после замораживания-отогрева сравнивали со значениями, полученными до замораживания после экспозиции клеток в средах. Гематокрит определяли в капиллярах с использованием микроцентрифуги МГЦ-8 (6800g).

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с использованием программ «MS Excel» и «Statgraphics 5.0. Plus». Данные на рисунках и в таблице представлены в виде среднего ± стандартная ошибка. Для оценки значимости различий исследуемых показателей применяли

cells post freeze-thawing), osmotic fragility (percentage of hemolysed cells after freeze-thawing and transferring into NaCl isotonic solution) and intracellular content of potassium and sodium ions. Hemolysis level and osmotic fragility of erythrocytes in the samples post freeze-thawing were measured spectrophotometrically at 540 nm by release of hemoglobin and scaled in terms of 100% hemolysis [11]. Intracellular content of potassium and sodium ions was measured using flame photometer PAZh-1 (USSR), to do this the erythrocyte suspension was centrifuged during 15 min at 230g, the supernatant was removed and the centrifuged erythrocyte samples of 150 µl were hemolyzed in distilled water. Content of potassium and sodium was measured in the procured solution and in the supernatant [11]; data shown in the article are scaled in terms of 100% hematocrit. The studied indices were evaluated prior to freezing after exposure in cryoprotective media and compared with the control: erythrocyte mass mixed with physiological saline in 1:1 ratio. Post-thaw values were respect of the values obtained prior to freezing after exposure of cells with media. Hematocrit was determined in capillaries using MGC-8 microcentrifuge (6800g).

The obtained results were statistically processed with Excel and Statgraphics 5.0. Plus software. Data in the Figures and Table are the mean ± standard error of the mean. Nonparametric Wilcoxon U-test for non-paired samples was used to assess statistical significance of the differences between studied indices. Pearson's analysis was used to evaluate the correlation between parameters. ANOVA test was used for statistical assessment of effect of solution composition, *i. e.* ratio between non-penetrating and penetrating cryoprotectants in the media.

Results and discussion

Assessment of cryoprotective efficiency of the media based on OEMC allowed to reveal the dependence of erythrocyte survival on composition of the media. Application of cryoprotective solutions combining OEMC and DMAc cryoprotectants resulted in an increasing of erythrocytes osmotic resistance in all the studied samples (Fig. 1) if compared with 'reference' solutions of OEMC. The media comprising the cryoprotectants in 1:1 and 3:1 ratios were the most effective. The indices of osmotic fragility of erythrocytes decreased in 2 times if compared to appropriate indices of erythrocytes after freeze-thawing in 20% OEMC solution and reduced in 4 times after freeze-thawing in 30% OEMC solution (Fig. 1). It should be noted that osmotic resistance of erythrocytes after freeze-thawing in medium with 5:1 OEMC and DMAc ratio was two times higher if compared with the one



непараметрический U-критерий Уилкоксона-Манна-Уитни для непарных выборок. Для оценки степени взаимообусловленности изменения параметров использовали корреляционный анализ Пирса; для статистической оценки эффекта состава раствора, т. е. соотношения непроникающего и проникающего криопротекторов в криозащитных средах – тест ANOVA.

Результаты и обсуждение

При исследовании криозащитной эффективности сред на основе ОЭМЦ установлена зависимость сохранности эритроцитов от состава этих сред. Использование криозащитных растворов, содержащих комбинации криопротекторов ОЭМЦ с ДМАц, приводило к повышению осмотической устойчивости эритроцитов во всех исследуемых образцах (рис. 1) по сравнению с «базовыми» растворами ОЭМЦ. Наиболее эффективными оказались среды, содержащие комбинации криопротекторов 1:1 и 3:1. Показатели осмотической хрупкости эритроцитов снижались в два раза относительно соответствующих показателей эритроцитов после замораживания-отогрева в 20%-м растворе ОЭМЦ и в 4 раза – 30%-м растворе ОЭМЦ (рис. 1). Следует отметить, что осмотическая устойчивость эритроцитов после замораживания-отогрева в среде с соотношением ОЭМЦ и ДМАц 5:1 была почти в два раза выше по сравнению с данными, полученными при использовании 30%-го раствора ОЭМЦ. Тест ANOVA выявил достоверный эффект состава раствора (т. е. соотношения непроникающего и проникающего криопротекторов) по показателю осмотической хрупкости ($F(4;27) = 6,3; p = 0,001$).

После замораживания-отогрева эритроцитов практически во всех исследованных криозащитных средах уровень гемолиза составлял 2–4% (рис. 2). Только в случае использования комбинированной среды, содержащей 10% ОЭМЦ и 5% ДМАц (соотношение 2:1) гемолиз повышался до 7%, т. е. указанные концентрации, вероятнее всего, недостаточно эффективны в данных условиях эксперимента.

Показателем, характеризующим целостность клеточной мембраны и функциональную полноценность эритроцитов после замораживания-отогрева, является внутриклеточное содержание ионов калия и натрия [5, 10, 27]. Ионы калия и натрия необходимы для поддержания мембранного потенциала, участвуют в функционировании

resulted from freeze-thawing of erythrocytes with 30% OEMC. ANOVA test revealed a significant effect of solution composition (ratio of non-penetrating and penetrating cryoprotectants in the media) on the index of osmotic fragility ($F(4;27) = 6.3; p = 0.001$).

Freeze-thawing of erythrocytes virtually in all the cryoprotective media resulted in hemolysis of 2–4% (Fig. 2). Only in the case of combined medium, combining 10% OEMC and 5% DMAc (2:1 ratio) post-thaw hemolysis increased up to 7%, *i. e.* these concentrations were likely non-optimal in the used experimental conditions.

Intracellular content of potassium and sodium ions could serve as the index characterizing cell membrane integrity and functional value of erythrocytes post freeze-thawing [5, 10, 27]. Potassium and sodium ions are important for membrane potential maintenance, contribute to intracellular enzymes function, osmotic and acid-base balances and other metabolic processes as well [18, 19]. Capacity to hold potassium cations within cells can be considered as basis for preserving their viability. The Table shows the data of intracellular content of these ions in erythrocytes prior to and post freeze-thawing in the media, containing 20 and 30% OEMC, as well as the combination with DMAc.

Rising intracellular potassium content in the studied samples prior to freezing after exposure in cryoprotective media is mainly associated with cell dehydration. Freeze-thawing resulted in a decrease of intracellular potassium content. Maximum preservation of this index (in average 88 and 81% of the value prior to freezing)

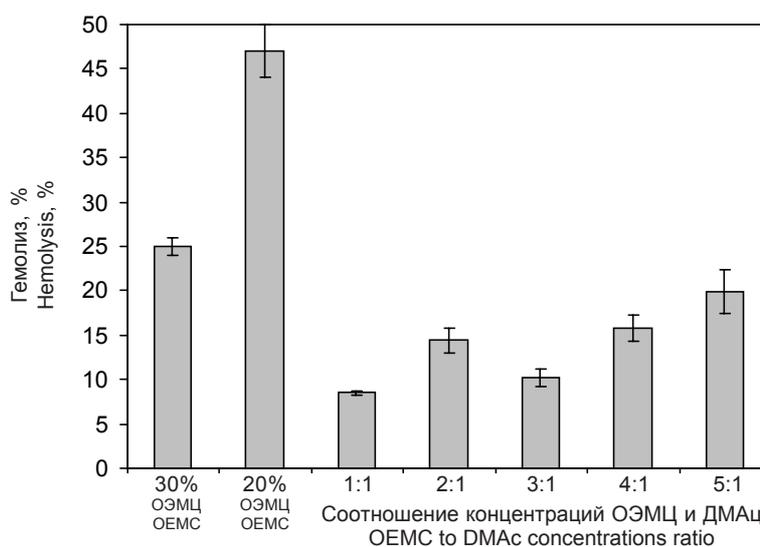


Рис. 1. Осмотическая хрупкость эритроцитов (гемолиз после переноса в изотоническую среду 0,9% NaCl) после замораживания-отогрева в растворах, содержащих комбинации криопротекторов.

Fig. 1. Osmotic fragility of erythrocytes (hemolysis after transferring to 0.9% NaCl isotonic media) after freeze-thawing in media with different cryoprotectants combinations.

внутриклеточных ферментов, поддержании осмотического, кислотно-основного равновесия, а также в других метаболических процессах [18, 19]. Способность удерживать катионы калия внутри клеток рассматривается как фундаментальное свойство сохранения их жизнеспособности. В таблице представлены значения внутриклеточного содержания этих ионов в эритроцитах до и после замораживания-отогрева в средах, содержащих 20 и 30% ОЭМЦ, а также в комбинированных средах с ДМАц.

Увеличение показателя внутриклеточного содержания калия в исследуемых образцах после экспозиции с криозащитными средами до замораживания обусловлено, главным образом, дегидратацией клеток. Замораживание-отогрев образцов привело к снижению внутриклеточного содержания калия. После замораживания-отогрева эритроцитов в средах с соотношением ОЭМЦ и ДМАц 1:1 и 3:1 отмечена максимальная сохранность внутриклеточного содержания калия (в среднем соответственно 88% и 81% от значения до замораживания). Более выраженное снижение содержания внутриклеточного калия отмечено в образцах эритроцитов после замораживания-отогрева в средах, содержащих ОЭМЦ с ДМАц в соотношениях 2:1 и 5:1 – до 68 и 66% от значения до замораживания соответственно. В первом случае это могло быть связано с недостаточной криозащитной эффективностью среды (из-за низкой концентрации ОЭМЦ и ДМАц – 10 и 5% соответственно), во втором, напротив, – высоким (25%) содержанием ОЭМЦ в среде (таблица). Максимальное снижение содержания калия наблюдалось в исследуемых образцах эритроцитов после замораживания-отогрева в среде с 30% ОЭМЦ, что, по-видимому, является следствием повреждения клеточных мембран и выхода калия из клеток. Сохранность внутриклеточного калия составляла в этом случае около 46% от значения до замораживания.

Внутриклеточное содержание натрия после криоконсервирования также зависело от состава криозащитных сред, в которых находились эритроциты. Достоверное увеличение внутриклеточного содержания натрия после замораживания-отогрева относительно показателей до замораживания отмечалось во всех исследуемых образцах (таблица). Наиболее высокое содержание внутриклеточного натрия в эритроцитах отмечалось после

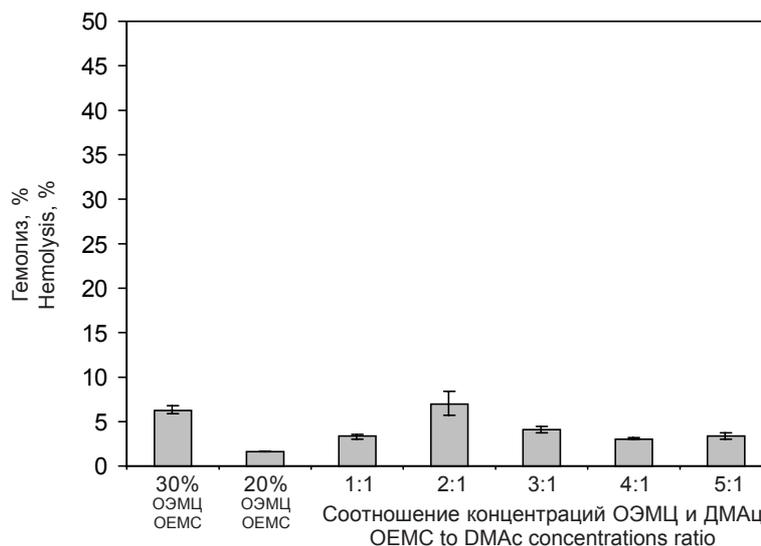


Рис. 2. Гемолиз эритроцитов после замораживания-отогрева в растворах, содержащих комбинации криопротекторов.

Fig. 2. Indices of erythrocytes hemolysis after freeze-thawing in different cryoprotective media.

was found after freeze-thawing of the erythrocytes in the media combining OEMC and DMAc in 1:1 and 3:1 ratios. Bigger reduction of intracellular potassium content was found in erythrocytes after freeze-thawing in the media containing OEMC and DMAc in 2:1 and 5:1 ratios: down to 68% and 66% of the value before freeze-thawing, correspondingly. In the first case it was likely associated with insignificant cryoprotective efficiency of the medium (due to low concentration of OEMC and DMAc, 10 and 5%, respectively), in the second case it was *vice versa* due to a high (25%) concentration of OEMC in the medium (Table). Maximum loss of potassium content in the cells was observed in the studied erythrocyte samples after freeze-thawing in the medium with 30% OEMC that was, probably, due to damages of cell membranes and potassium efflux out of the cells. Intracellular potassium content made in average only 46% of the index prior to freezing.

Intracellular sodium content after freeze-thawing also depended on composition of cryoprotective media, used for erythrocytes cryopreservation. Post-thaw intracellular sodium content increased significantly if compared with the indices prior to freezing in all the studied samples (Table). The highest intracellular sodium content in erythrocytes was revealed after their freeze-thawing in the media, containing 20 and 30% OEMC and combinations of OEMC and DMAc in 5:1 ratio.

Thus the obtained results testify to the fact that intracellular potassium and sodium content after freeze-thawing of erythrocytes depends on the composition



Внутриклеточное содержание калия и натрия в эритроцитах после экспозиции и после замораживания-отогрева в криозащитных средах разного состава
Indices of intracellular content of potassium and sodium in erythrocytes post exposure and following freeze-thawing in different cryoprotective media

Состав сред Media composition	Содержание калия, ммоль/л Potassium content, mmol/l		Содержание натрия, ммоль/л Sodium content, mmol/l	
	после экспозиции post exposure	после замораживания-отогрева post-thaw	после экспозиции post exposure	после замораживания-отогрева post-thaw
Физиологический раствор (контроль) Physiological saline (control)	84,80 ± 2,93	-	17,35 ± 3,69	-
20% ОЭМЦ 20% OEMC	117,05 ± 10,73*	74,75 ± 5,68 [#]	21,58 ± 6,33	46,11 ± 3,44 [#]
30% ОЭМЦ 30% OEMC	106,22 ± 1,14*	48,36 ± 7,95 [#]	37,11 ± 2,98*	55,01 ± 6,10 [#]
ОЭМЦ:DMAc 1:1 OEMC:DMAc 1:1	92,64 ± 7,36	81,45 ± 6,79	13,93 ± 2,69	32,64 ± 2,32 [#]
ОЭМЦ:DMAc 2:1 OEMC:DMAc 2:1	94,59 ± 5,35*	64,38 ± 5,17 [#]	18,06 ± 1,96	30,59 ± 2,86 [#]
ОЭМЦ:DMAc 3:1 OEMC:DMAc 3:1	99,26 ± 6,83*	79,61 ± 2,89 [#]	19,33 ± 2,04	29,35 ± 4,09 [#]
ОЭМЦ:DMAc 4:1 OEMC:DMAc 4:1	100,91 ± 3,64*	75,47 ± 5,98 [#]	21,39 ± 2,82	32,99 ± 2,98 [#]
ОЭМЦ:DMAc 5:1 OEMC:DMAc 5:1	101,41 ± 4,26*	67,31 ± 3,86 [#]	19,13 ± 2,20	35,48 ± 2,21 [#]

Примечания: * – различия значимы по сравнению с показателями контроля (физиологический раствор); # – различия значимы по сравнению с показателями до замораживания после экспозиции в криозащитных средах; $p \leq 0,05$.

Notes: * – differences are significant comparing to the control (physiological saline); # – differences are significant comparing to the values prior to freezing and after exposure in cryoprotective media; $p \leq 0.05$.

замораживания-отогрева в средах, содержащих 20 и 30% ОЭМЦ, а также комбинацию ОЭМЦ с DMAc в соотношении 5:1.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что внутриклеточное содержание ионов калия и натрия после замораживания-отогрева эритроцитов зависит от состава используемых криозащитных сред. Следует отметить, что максимальная потеря клетками калия и поступление в них натрия отмечались после замораживания-отогрева эритроцитов в растворах с 30% ОЭМЦ. Присутствие DMAc в криозащитной среде в соотношении с ОЭМЦ 1:1 и 3:1 повышало устойчивость клеточных мембран эритроцитов, что подтверждается данными по осмотической хрупкости эритроцитов после их переноса в изотоническую среду (см. рис. 1).

На рис. 3 представлены показатели гематокрита после экспозиции эритроцитов в исследуемых криозащитных средах. Известно, что гематокрит является одним из показателей, характеризующих изменение объема эритроцитов в суспензии [26].

of the used cryoprotective media. It should be noted that maximum efflux of potassium and influx of sodium were observed after freeze-thawing of erythrocytes in the solutions with 30% OEMC. The presence of DMAc in cryoprotective medium with OEMC in 1:1 and 3:1 concentration ratios increased the resistance of cell membranes of erythrocytes that was confirmed by the data of osmotic fragility of erythrocytes after their placing into isotonic medium (see Fig. 1).

Fig. 3 represents the indices of hematocrit after exposure of erythrocytes in the studied cryoprotective media. It has been known that hematocrit is one of the indices characterizing the change of erythrocyte volume in suspension [26]. It is seen, that exposure of erythrocytes in the media with different composition prior to freezing led to a cell dehydration of various extent. Hematocrit value at exposure stage was found to correlate with OEMC and DMAc ratio in cryoprotective media and erythrocyte survival indices after freeze-thawing. After exposure of erythrocytes in cryoprotective media with the same concentration of OEMC and with DMAc in ratios of 1:1 (10 and 10%,

На этапе экспозиции эритроцитов в различных средах до замораживания наблюдается разная степень дегидратации клеток. Нами были установлены зависимость изменения гематокрита на этапе экспозиции от соотношения ОЭМЦ и ДМАц в криозащитных средах и его связь с показателями сохранности эритроцитов после замораживания-отогрева. После экспозиции эритроцитов в криозащитных средах с одинаковой концентрацией непроницающего криопротектора ОЭМЦ в соотношениях с ДМАц 1:1 (10 и 10% соответственно) и 2:1 (10 и 5% соответственно) мы отмечали разные показатели гематокрита (рис. 3). Присутствие ДМАц в концентрации 10% в среде (соотношение 1:1) способствовало незначительному снижению гематокрита, в среднем на 8% относительно контроля (эритроциты в физиологическом растворе), что может свидетельствовать о менее выраженной дегидратации клеток после экспозиции в криозащитной среде. Сохранность эритроцитов после замораживания-отогрева в этой среде и переноса в изотоническую среду составляла в среднем 92% (см. рис. 1). После экспозиции эритроцитов в криозащитной среде с соотношением криопротекторов 3:1 показатель гематокрита уменьшился в среднем на 19% относительно контроля. Увеличение концентрации ОЭМЦ в средах с соотношением 4:1 (20% ОЭМЦ и 5% ДМАц) и 5:1 (25% ОЭМЦ и 5% ДМАц) приводило к снижению показателя гематокрита на 23 и 29% соответственно, и уменьшению сохранности эритроцитов после замораживания-отогрева. Максимальное снижение гематокрита, в среднем на 30 и 33%, отмечалось после экспозиции эритроцитов в криозащитных средах, содержащих 20 и 30% ОЭМЦ соответственно. Сохранность эритроцитов после замораживания-отогрева в этих средах была достоверно ниже (см. рис.1, таблица). Известно, что амиды обладают выраженной дифильностью, т. е. гидрофобностью и гидрофильностью одновременно [8]. Проникая преимущественно через липидные компоненты клеточных мембран, ДМАц может образовывать водородные связи с водой через атом кислорода карбонильной группы и препятствовать, с одной стороны, чрезмерному обезвоживанию эритроцитов, а с другой, внутриклеточной кристаллизации [3, 8]. Таким образом, присутствие непроницающего криопротектора ОЭМЦ и

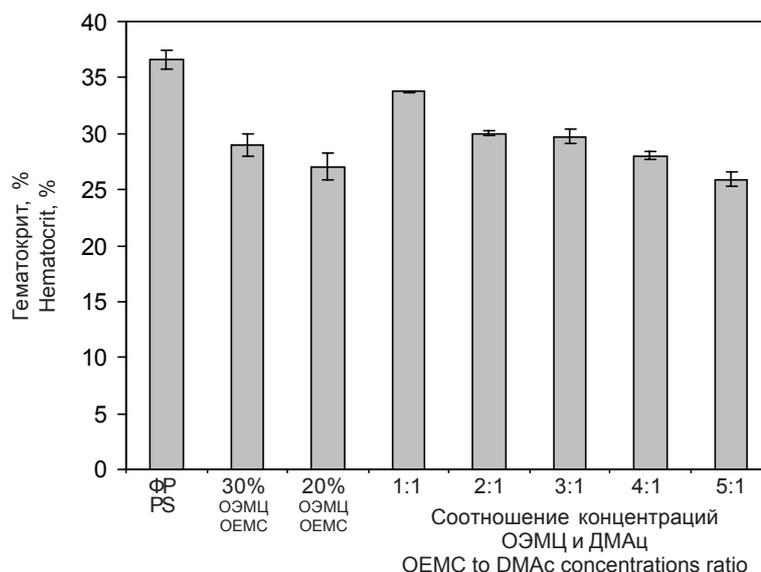


Рис. 3. Гематокрит после экспозиции эритроцитов в средах с разным составом (до замораживания); * – различия значимы по сравнению с контролем (эритроцитами в физиологическом растворе (ФР)); $p \leq 0,05$.

Fig. 3. Indices of hematocrit after exposure of erythrocytes in media with different composition (before freezing); * – differences are significant if compared with the control (erythrocytes in physiological saline (PS)); $p \leq 0.05$.

correspondingly) and 2:1 (10 and 5%, correspondingly) we revealed different indices of hematocrit (Fig. 3). The presence of 10% DMAc in the medium (with 1:1 ratio) enabled the insignificant reduction of hematocrit in average by 8% comparing to the control (erythrocytes in physiological saline), that could testify to a less expressed cell dehydration after exposure in this cryoprotective medium. Survival of erythrocytes after freeze-thawing in this cryoprotective medium and transferring to isotonic solution was 92% in average (see Fig. 1). After exposure of erythrocytes in the cryoprotective medium with 3:1 ratio of cryoprotectants the hematocrit value decreased in average by 19% comparing to the control. Increasing the concentration of OEMC in the media with ratios 4:1 (20% OEMC and 5% DMAc) and 5:1 (25% OEMC and 5% DMAc) resulted in a decrease of hematocrit by 23 and 29%, correspondingly, and fall of post-thaw survival of erythrocytes. Maximum reduction of hematocrit, in average by 30 and 33%, was revealed after exposure of erythrocytes in cryoprotective media, containing 20 and 30% OEMC, correspondingly. Post-thaw survival indices of erythrocytes in these media were significantly lower (see Fig. 1, Table). Amides are known to be diphilic substances, *i.e.* possess simultaneously hydrophobic and hydrophilic properties [8]. Penetrating mainly through lipid components of cell membranes, DMAc can form hydrogen bonds with water *via* oxygen



проникающего криопротектора ДМАц в средах в соотношениях 1:1 и 3:1 позволило снизить как негативное влияние чрезмерной дегидратации клеток до замораживания, так и повреждающее действие внутриклеточной кристаллизации при замораживании-отогреве, т. е. повысить эффективность комбинированных криозащитных сред.

Для оценки взаимосвязи показателей сохранности эритроцитов до и после замораживания-отогрева был проведен корреляционный анализ. Установлена отрицательная корреляция показателя гематокрита на этапе экспозиции клеток с криозащитными средами и осмотической хрупкостью эритроцитов после замораживания ($k = -0,92$). Выявлена отрицательная корреляция осмотической хрупкости с сохранностью внутриклеточного калия ($k = -0,90$) и положительная ($k = 0,66$) с содержанием натрия после замораживания-отогрева. Потеря клетками калия и поступление в них натрия являются одними из существенных критериев наличия скрытых повреждений плазматической мембраны, что подтверждается показателями осмотической хрупкости после помещения размороженных эритроцитов в изотонический раствор NaCl.

В наших предыдущих исследованиях криозащитных свойств сред на основе ОЭМЦ показано, что сохранность эритроцитов человека после замораживания-отогрева зависела от состава среды и соотношения ее компонентов. Так, включение углеводов (сахарозы, маннита, глюкозы) с одновременным снижением содержания NaCl в составе криозащитных сред на основе ОЭМЦ способствовало повышению сохранности эритроцитов. Однако показатели осмотической хрупкости размороженных эритроцитов после переноса в изотоническую среду оставались на высоком уровне [12]. Использование комбинированных сред, включающих ОЭМЦ и ДМАц, в данном исследовании позволило снизить показатели осмотической хрупкости эритроцитов после замораживания-отогрева. Это можно объяснить снижением осмотической нагрузки на клеточную мембрану в процессе криоконсервирования, включая менее выраженную дегидратацию клеток на этапе экспозиции. Комбинация криопротекторов ОЭМЦ и ДМАц, относящихся к разным классам химических соединений и обладающих разным механизмом защитного действия, позволила снизить исходную концентрацию непроникающего криопротектора в 2 раза (до 10%) в среде с соотношением ОЭМЦ и ДМАц 1:1 и в 1,5 раза (до 15%) – в среде с соотношением ОЭМЦ и ДМАц 3:1. Криозащитная эффективность этих сред была достоверно выше «базовых»

of carbonyl group and prevent, on one hand, extreme dehydration of erythrocytes, and, on another, unfavourable the intracellular crystallization [3, 8]. Thus, the combination of non-penetrating cryoprotectant OEMC and penetrating cryoprotectant DMAc in the media with 1:1 and 3:1 ratios provided a decrease of negative effect of cell dehydration during exposure stage and reduction of damaging effect exhibited by intracellular crystallization during freeze-thawing, thereby increased the cryoprotective efficiency of combined media.

We performed analysis to assess correlations between indices characterizing erythrocytes state prior to and after freezing. A negative correlation was found between hematocrit value during exposure of cells in cryoprotective media and post-thaw osmotic fragility of erythrocytes ($k = -0.92$). Osmotic fragility correlated with post-thaw ion content: negatively ($k = -0.90$) with the one of potassium and positively ($k = 0.66$) with sodium. Potassium efflux and sodium influx are one of the important criteria of latent damages of plasma membrane, that was also confirmed by the indices of osmotic fragility (amount of hemolysed cells placed into isotonic NaCl solution post-thaw).

Our previously reported investigations of cryoprotective properties of the media based on OEMC showed that post-thaw survival of erythrocytes depended on the nature of media components and their ratio. For example, supplementation of the OEMC based media with carbohydrates (sucrose, mannitol, glucose) with simultaneous reduction of NaCl content resulted in an increase of erythrocytes survival. Nevertheless, post-thaw erythrocytes were characterized by high indices of osmotic fragility after transfer to isotonic medium [12]. Application of media combining OEMC and DMAc in this research enabled to reduce the indices of osmotic fragility of erythrocytes after freeze-thawing. This could be explained by reduction of osmotic load onto the cell membrane during cryopreservation, in particular, less expressed cell dehydration during exposure in cryoprotective media. Combination of OEMC and DMAc cryoprotectants, referring to different classes of chemical compounds and exhibiting various mechanism of protective effect, allowed to reduce the initial concentration of non-penetrating cryoprotectant twice (down to 10%) in the medium with OEMC and DMAc in 1:1 ratio in 1.5 times (down to 15%) in the medium with OEMC and DMAc in 3:1 ratio. Cryoprotective efficiency of these media was significantly higher than that of 'reference' solutions with 20 and 30% OEMC. High level of erythrocytes survival was achieved at reduced concentration of cryoprotectants in the medium, *i. e.* potentially low toxicity both at cellular and organism level. It is one of



растворов с 20 и 30% ОЭМЦ. Снижение содержания криопротекторов в криозащитной среде позволяет уменьшить ее токсичность на клеточном и организменном уровне. Это является одним из важных условий создания безотмывочных методов криоконсервирования эритроцитов для клинической практики.

Выводы

1. Показана эффективность использования криозащитных сред, содержащих комбинации непроницающего (ОЭМЦ) и проникающего криопротекторов (ДМАц) для замораживания эритроцитов человека.

2. Определены соотношения концентраций ОЭМЦ и ДМАц в криозащитной среде 1:1 (10 и 10% масс. соответственно) и 3:1 (15 и 5% масс. соответственно), обеспечивающие максимальную сохранность эритроцитов после замораживания-отогрева.

3. Использование криозащитных сред, содержащих ОЭМЦ и ДМАц в соотношении 10 и 10% масс., а также 15 и 5% масс. соответственно позволило снизить концентрацию непроницающего криопротектора ОЭМЦ по сравнению с «базовыми» растворами 20 и 30% ОЭМЦ и при этом повысить осмотическую устойчивость криоконсервированных эритроцитов: сохранность размороженных эритроцитов после помещения их в изотоническую среду NaCl составляла в среднем 92%.

4. Установлена корреляция осмотической хрупкости эритроцитов после замораживания-отогрева с показателями гематокрита до замораживания после экспозиции в средах ($k = -0,92$), а также показателями внутриклеточного содержания калия ($k = -0,90$) и натрия ($k = 0,66$) после замораживания-отогрева.

Литература

1. Бабийчук Л.А., Землянских Н.Г. Оптимизация и преимущества безотмывочного метода криоконсервирования эритроцитов с ПЭО-1500 // Проблемы криобиологии. – 2001. – №1. – С. 35–41.
2. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. – К.: Наук. думка, 1994. – 430 с.
3. Бидный С.Ю., Аверьянов М.В., Серебряков В.Г. и др. Фазовые превращения в системе диметилацетамид-вода // Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов: Сб. науч. трудов. – Харьков, 1990. – С. 5–8.
4. Богданчикова О.А., Киреев В.А., Ходько А.Т., Компаниец А.М. Криоконсервирование тромбоцитов. 2. Эффективность криоконсервантов на основе комбинаций криопротекторов при различных режимах замораживания // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, №4. – С. 443–451.

the important requirements in developing 'no-wash' techniques to cryopreserve erythrocytes for clinical application.

Conclusions

1. Cryoprotective media combining non-penetrating cryoprotectant OEMC and penetrating cryoprotectant DMAc are effective to cryopreserve human erythrocytes.

2. Highest post-thaw survival of erythrocytes could be achieved when using cryoprotective medium with OEMC and DMAc ratios of 1:1 (10 and 10% w/w, correspondingly) and 3:1 (15 and 5% w/w, correspondingly).

3. Using of cryoprotective media combining OEMC and DMAc with 10 and 10% w/w, 15 and 5% w/w, correspondingly allows to reduce the concentration of non-penetrating cryoprotectant OEMC if compared with 'reference' media with 20 and 30% w/w OEMC, and to elevate osmotic resistance of cryopreserved erythrocytes: survival of frozen-thawed erythrocytes after transferring them into isotonic solution of NaCl was 92% in average.

4. Postthaw osmotic fragility of erythrocytes correlates with hematocrit indices measured before freezing after exposure in the media ($k = -0.92$) and post-thaw intracellular content of potassium ($k = -0.90$) and sodium ($k = 0.66$).

References

1. Babijchuk L.A., Zemlyanskikh N.G. Optimization and advantages of washing-out method for erythrocytes cryopreservation with PEO-1500 // Problems of Cryobiology. – 2001. – N1. – P. 35–41.
2. Belous A.M., Grischenko V.I. Cryobiology. – Kiev: Naukova Dumka, 1994. – 430 p.
3. Bidnyy S.Yu., Averyanov M.V., Serebryakov V.G. et al. Phase transformations in dimethyl acetamide water system // Physicochemical properties and biological effect of cryoprotectants: Collection of scientific papers. – Kharkov, 1990. – P. 5–8.
4. Bogdanichikova O.A., Kireev V.A., Khodko A.T., Kompaniets A.M. Platelet cryopreservation. 2. Efficiency of cryoprotectants based on cryoprotectant combinations under different freezing regimens // Problems of Cryobiology. – 2010. – Vol. 20, N4. – P. 443–451.
5. Gulevsky A.K., Bondarenko V.A., Belous A.M. Barrier properties of biomembranes at low temperatures. – Kiev: Naukova Dumka, 1988. – 208 p.
6. Zinchenko A.V., Krasnikova A.O., Musatova I.B. et al. Phase behaviour of hydro-oxyethylated methyl cellosolve system with polymerization degree of $n=33-35$ below 273 K // Proceeding of the 5th Ukrainian Biophysical Society Meeting. – Lutsk, 2011. – P. 152.
7. Kompaniets A.M., Nikolenko A.V., Chekanova V.V., Trots Yu.P. Cryopreservation of erythrocytes under oligomer of oxyethylated glycerol ($n = 25$) // Problems of Cryobiology. – 2005. – Vol.15, N3. – P. 561–565.



5. Гулевский А.К., Бондаренко В.А., Белоус А.М. Барьерные свойства биомембран при низких температурах. – К.: Наук. думка, 1988. – 208 с.
6. Зинченко А.В., Красникова А.О., Мусатова И.Б., Чеканова В.В., Компаниец А.М. Фазовое поведение системы вода-оксиэтилированный метилцеллозольв со степенью полимеризации $n = 33-35$ ниже 273 K // Збірник тез доповідей V з'їзду Українського біофізичного товариства. – Луцк, 2011. – С. 152.
7. Компаниец А.М., Николенко А.В., Чеканова В.В., Троц Ю.П. Криоконсервирование эритроцитов под защитой олигомера оксиэтилированного глицерина ($n = 25$) // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т.15, №3. – С. 561–565.
8. Линник Т.П. Амиды алифатических кислот – эффективные криопротекторы. II. Криозащитные свойства соединений ряда амидов // Проблемы криобиологии. – 1999, №2. – С. 22–31.
9. Линник Т.П., Мартынюк И.Н., Гавилей О.В., Белецкий Е.М. Цитотоксическое действие диолов, амидов и их смесей на сперму петухов и индюков до замораживания // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, №4, – С. 383–394.
10. Лоевский М.М., Воротилин А.М., Гулевский А.К., Белоус А.М. Динамика содержания катионов и фосфорорганических соединений в эритроцитах после низкотемпературной консервации (-196°C) под защитой 1,2-пропандиола и глицерина // Бюлл. экспер. биол. – 1982. – Т. 94, №9. – С. 95–97.
11. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике: Методы гематологических исследований. – М.: Медицина, 1987. – 363 с.
12. Николенко А.В., Вязовская О.В. Исследование сохранности эритроцитов в зависимости от состава криозащитной среды на основе непроникающего криопротектора оксиэтилированного метилцеллозольва // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія «Біологія». – 2011. – №947, Вип. 13. – С. 152–158.
13. Новиков А.Н., Кулешова Л.Г., Линник Т.П. Механизмы роста кристаллов льда в сложных биологических системах // Биофизика. – 1991. – Т. 36, №1. – С. 122–127.
14. Пушкарь Н.С., Белоус А.М. Введение в криобиологию. – Киев: Наук. думка, 1975. – 344 с.
15. Рамазанов В.В. Криозащитная эффективность комбинированной среды с непроникающим и проникающим криопротекторами при замораживании эритроцитарных суспензий различного объема // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т. 23, №2. – С. 124–134.
16. А.с. №1622995, СССР, МПК А61N1/02. Криопротектор эритроцитов человека / Л.П. Бредихина, О.В. Липина, Л.А. Ханина и др. – Заявл. 03.10.1988, №4489413/30-14; 1991; Бюл. №1.
17. Патент 2326532, РФ, МПК А01N1/02. Способ криоконсервирования тромбоцитов / А.А. Костяев, Ф.С. Шерстнев, С.В. Утемов и др. – Заявл. 29.08.2006; Публ. 20.06.2008; Бюл. №17.
18. Crawford A., Harris H. Balancing act: Na^+ sodium K^+ potassium // Nursing. – 2011. – Vol. 41, Issue 7. – P. 44–50.
19. Edwards S. Regulation of water, sodium and potassium: implications for practice // Nursing Standard. – 2001. – Vol. 15, №22. – P. 36–42.
20. Glafke C., Akhoondi M., Oldenhof H. et al. Cryopreservation of platelets using trehalose: the role of membrane phase behavior during freezing // Biotechnol. Prog. – 2012. – Vol. 28, №5. – P. 1347–1354.
21. Grove H., Oliver. A.E., Yoekstra F.A., Grove L.M. Stabilization of dry membrane by mixtures of hydroxyethyl starch and glucose: the role of vitrification // Cryobiology. – 1997. – Vol. 35, №1. – P. 20–30.
22. Nikolenko A.V., Chekanova V.V., Schetinsky M.I., Vyazovska O.V. Relation between cryoprotective and physicochemical properties of oxyethylated methyl cellosolve-based media // Cryoletters. – 2013. – Vol. 34, №5. – P. 527–534.
23. Petrenko Y.A., Jones D.R.E., Petrenko A.Y. Cryopreservation of human fetal liver hematopoietic stem / progenitor cells using sucrose as an additive to the cryoprotective medium // Cryobiology. – 2008. – Vol. 57, N3. – P. 195–200.
24. Quan G.B., Han Y., Liu M.X., Gao F. Effects of pre-freeze incubation of human red blood cells with various sugars on postthaw recovery when using a dextran-rapid cooling protocol // Cryobiology. – 2009. – Vol. 59, N3. – P. 258–267.
25. Quan G.B., Han Y., Liu M.X. et al. Addition of oligosaccharide decreases the freezing lesions on human red blood cell membrane in the presence of dextran and glucose // Cryobiology. – 2011. – Vol. 62, N2. – P. 135–144.
26. Savitz D., Sidel V.W., Solomon A.K. Osmotic properties of human red cells // J. Gen. Physiol. – 1964. – Vol. 48, N1. – P. 79–94.
8. Linnik T.P. Amides of aliphatic acids are effective cryoprotectants. II. Cryoprotective properties of compounds of amides series // Problems of Cryobiology. – 1999. – N2. – P. 22–31.
9. Linnik T.P., Martynuk I.N., Gaviley O.V., Beletsky E.M. Cytotoxic effect of diols, amides and their mixtures on fowl and turkey sperm prior to freezing // Problems of Cryobiology. – 2009. – Vol.19, N4. – P. 383–394.
10. Loevsky M.M., Vorotilin A.M., Gulevsky A.K., Belous A.M. Dynamics of content of cations and phosphoorganic compounds in erythrocytes after low-temperature preservation (-196°C) under protection of 1,2-propane diol and glycerol // Bull. Eksp. Biol. – 1982. – Vol. 94, N9. – P. 95–97.
11. Menshikov V.V. Laboratory methods of research in clinic: Methods of hematological studies. – Moscow: Meditsyna, 1987. – 363 p.
12. Nikolenko A.V., Vyazovskaya O.V. Studying survival of erythrocytes depending on composition of cryoprotective media based on non-penetrating cryoprotectant oxyethylated methyl cellosolve // Visnyk Kharkivskogo Natsionalnogo Universytetu Imeni V.N. Karazina. Series: Biologiya. – 2011. – N947, Issue 13. – P. 152–158.
13. Novikov A.N., Kuleshova L.G., Linnik T.P. Mechanisms of growth of ice crystals in complex biology systems // Biofizika. – 1991. – Vol. 36, N1. – P. 122–127.
14. Pushkar N.S., Belous A.M. Introduction into cryobiology. – Kiev: Naukova Dumka. – 1975. – 344 p.
15. Ramazanov V.V. Cryoprotective efficiency of medium combining non-penetrating and penetrating cryoprotectants when freezing erythrocyte suspensions of various volumes // Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2013. – Vol. 23, N2. – P. 124–134.
16. Pat.1622995 of USSR, IPC A61N1/02. Cryoprotectant for human erythrocytes / L.P. Bredikhina, O.V. Lipina, L.A. Khanina et al.; N4489413/30-14; Filed 03.10.1988; Publ. 1991; Bull. 1.
17. Pat. 2326532 of Russian Federation, IPC A01N1/02. Cryopreservation method of platelets / A.A. Kostyaev, F.S. Sherstnev, S.V. Utemov et al.; Filed 29.08.2006; Publ. 20.06.2008; Bull. 17.
18. Crawford A., Harris H. Balancing act: Na^+ sodium K^+ potassium // Nursing. –2011. – Vol. 41, Issue 7. – P. 44–50.
19. Edwards S. Regulation of water, sodium and potassium: implications for practice // Nursing Standard. – 2001. – Vol. 15, N22. – P. 36–42.
20. Glafke C., Akhoondi M., Oldenhof H. et al. Cryopreservation of platelets using trehalose: the role of membrane phase behavior during freezing // Biotechnol. Prog. – 2012. – Vol. 28, N5. – P. 1347–1354.
21. Grove H., Oliver. A.E., Yoekstra F.A., Grove L.M. Stabilization of dry membrane by mixtures of hydroxyethyl starch and glucose: the role of vitrification // Cryobiology. – 1997. – Vol. 35, N1. – P. 20–30.
22. Nikolenko A.V., Chekanova V.V., Schetinsky M.I., Vyazovska O.V. Relation between cryoprotective and physicochemical properties of oxyethylated methyl cellosolve-based media // Cryoletters. – 2013. – Vol. 34, N5. – P. 527–534.
23. Petrenko Y.A., Jones D.R.E., Petrenko A.Y. Cryopreservation of human fetal liver hematopoietic stem / progenitor cells using sucrose as an additive to the cryoprotective medium // Cryobiology. – 2008. –Vol. 57, N3. – P. 195–200.
24. Quan G.B., Han Y., Liu M.X., Gao F. Effects of pre-freeze incubation of human red blood cells with various sugars on postthaw recovery when using a dextran-rapid cooling protocol // Cryobiology. – 2009. – Vol. 59, N3. – P. 258–267.
25. Quan G.B., Han Y., Liu M.X. et al. Addition of oligosaccharide decreases the freezing lesions on human red blood cell membrane in the presence of dextran and glucose // Cryobiology. – 2011. – Vol. 62, N2. – P. 135–144.
26. Savitz D., Sidel V.W., Solomon A.K. Osmotic properties of human red cells // J. Gen. Physiol. – 1964. – Vol. 48, N1. – P. 79–94.

23. Petrenko Y.A., Jones D.R.E., Petrenko A.Y. Cryopreservation of human fetal liver hematopoietic stem / progenitor cells using sucrose as an additive to the cryoprotective medium // *Cryobiology*. – 2008. – Vol. 57, №3. – P. 195–200.
24. Quan G.B., Han Y., Liu M.X., Gao F. Effects of pre-freeze incubation of human red blood cells with various sugars on postthaw recovery when using a dextran-rapid cooling protocol // *Cryobiology*. – 2009. – Vol. 59, №3. – P. 258–267.
25. Quan G.B., Han Y., Liu M.X. et al. Addition of oligosaccharide decreases the freezing lesions on human red blood cell membrane in the presence of dextran and glucose // *Cryobiology*. – 2011. – Vol. 62, №2. – P. 135–144.
26. Savitz D., Sidel V.W., Solomon A.K. Osmotic properties of human red cells // *J. Gen. Physiol.* – 1964. – Vol. 48, №1. – P. 79–94.
27. Valeri C.R. Blood banking and the use of frozen blood products. – Cleveland: CRC Press, 1976. – 417 p.
28. Zhivotova E.N., Zinchenko A.V., Kuleshova L.G., Chekanova V.V., Kompaniets A.M. Physical states of aqueous solutions of oxyethylated glycerol with polymerization degree of $n = 30$ at temperatures lower than 283 K // *CryoLetters*. – 2007. – Vol. 28, №4. – P. 261–270.

