

Проявление и устранение эффекта “упаковки” в средах с непроникающими и проникающими криопротекторами

UDC 57.043:612.111: 547.422

V.V. RAMAZANOV*, V.A. BONDARENKO

Manifestation and Elimination of “Packing” Effect in the Media with Non-Penetrative and Penetrative Cryoprotectants

Исследовали повреждение эритроцитов при замораживании с низким (0,8%) и высоким (40%) гематокритом в средах с непроникающими полимерными криопротекторами (полиэтиленгликоль с м. м. 1500 (ПЭГ-1500), декстран) и проникающим криопротектором диметилсульфоксидом (ДМСО). Установлено, что проявление и устранение эффекта «упаковки» существенно зависят от ионной силы криоконсерванта. При физиологической ионной силе (0,15 моль/л NaCl) для проявления данного эффекта необходимо сочетание ПЭГ-1500 или декстрана в концентрациях 5 и 10% соответственно с ДМСО в концентрации 5% или увеличение количества ПЭГ-1500 и декстрана до 10 и 15% соответственно. Если ионная сила ниже физиологической (0,05 моль/л NaCl), то указанного сочетания полимерных криопротекторов и ДМСО достаточно для устранения эффекта «упаковки». Однако при физиологической ионной силе для устранения данного эффекта необходимо количество ДМСО в концентрации 15%. Анализ полученных результатов и данных литературы позволяет предположить, что в условиях быстрого замораживания-отогрева проявление эффекта «упаковки» определяется стадией быстрого отогрева, когда происходит приrost осмотического воздействия за счет разведения внешней среды водой, которая изначально была внутриклеточной. Сужение границ изменения объема клеток в цикле замораживания-отогрева в среде с проникающими и непроникающими криопротекторами приводит к возникновению устойчивости к указанному осмотическому воздействию и устранению эффекта «упаковки».

Ключевые слова: эритроциты, проникающие и непроникающие криопротекторы, эффект «упаковки».

Досліджували ушкодження еритроцитів при заморожуванні з низьким (0,8%) і високим (40%) гематокритом у середовищах, які містять непроникаючі полімерні криопротектори (поліетиленгліколь з м. м. 1500 (ПЕГ-1500), декстран) та проникаючий криопротектор диметилсульфоксид (ДМСО). Установлено, що прояв і усунення ефекту «упакування» істотно залежать від іонної сили криоконсерванта. При фізіологічній іонній силі (0,15 моль/л NaCl) для прояву даного ефекту необхідно комбінування ПЕГ-1500 або декстрану в концентраціях 5 та 10% відповідно з криопротектором ДМСО в концентрації 5% або збільшення кількості ПЕГ-1500 та декстрану до 10 і 15% відповідно. Якщо іонна сила нижче фізіологічної (0,05 моль/л NaCl), то зазначеного комбінування полімерних криопротекторів і ДМСО достатньо для усунення ефекту «упакування». Однак при фізіологічній іонній силі для усунення даного ефекту необхідна кількість ДМСО в концентрації 15%. Аналіз отриманих результатів і даних літератури дозволяє припустити, що в умовах швидкого заморожування-відігріву прояв ефекту «упакування» визначається стадією швидкого відігріву, коли відбувається приrost осмотичного впливу за рахунок розведення зовнішнього середовища водою, що споконвічно була внутрішньо-клітинною. Звуження границь зміни обсягу клітин у циклі заморожування-відігріву у середовищі, яке містить проникаючі й непроникаючі криопротектори, призводить до виникнення стійкості до зазначеного осмотичного впливу та усунення ефекту «упакування».

Ключові слова: еритроцити, проникаючі та непроникаючі криопротектори, ефект «упакування».

Erythrocyte damage under freezing with low and high hematocrits (0.8 and 40%, correspondingly) in the media with non-penetrative polymer cryoprotectants (polyethylene glycol with m. w. of 1500 (PEG-1500), dextran) and dimethyl sulfoxide (DMSO) penetrative one, was investigated. The manifestation and elimination of the “packing” effect were established to be significantly dependent on cryopreservative ionic strength. Under physiological ionic strength (0.15 mol/l NaCl) for this effect manifestation it is necessary to combine PEG-1500 or dextran in 5 and 10% concentrations, correspondingly, with 5% DMSO or increase PEG-1500 or dextran number up to 10 and 15%, correspondingly. If ionic strength is lower than physiological one (0.05 mol/l NaCl), the mentioned combination of polymer cryoprotectants and DMSO is sufficient to eliminate the “packing” effect. However for this effect elimination under physiological ionic strength of necessity is 15% DMSO. The analysis of the obtained results and literature data enable assuming the manifestation of “packing” effect under rapid freeze-thawing to be determined by the stage of rapid thawing, when the increment of osmotic effect occurs due to the environment dilution with water, being initially intracellular one. Narrowing of boundaries of cell volume change during freeze-thawing cycle in the medium with penetrative and non-penetrative cryoprotectants results in resistance to the mentioned osmotic effect and “packing” effect elimination.

Key-words: erythrocytes, penetrative and non-penetrative cryoprotectants, “packing” effect.

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Перейславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38
(057) 373-41-35, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:
cryo@online.kharkov.ua

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
4135, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Комбинирование в среде замораживания непроницающих полимерных криопротекторов с проникающими позволяет снизить концентрацию последних без изменения сохранности и осмотической устойчивости замороженных клеток [2, 3, 9]. Кроме того, использование комбинированных криоконсервантов устраняет необходимость контроля скорости охлаждения [5, 26, 27]. Это указывает на существование общих причин повреждения различных клеток, которые предотвращаются комбинированной криопротекцией с непроницающими и проникающими криопротекторами.

Использование комбинированного криоконсерванта гидроксипропилированный крахмал (ГЭК) + диметилсульфоксид (ДМСО) по сравнению со средой, содержащей только ДМСО, приводит к уменьшению степени переохлаждения образца в момент кристаллизации [13, 27]. Предполагается, что замораживание суспензий с высокой концентрацией клеток, по сравнению с низкой, приводит к большему переохлаждению образцов [21]. Такие данные указывают на то, что механизм криозащитного действия комбинированных криоконсервантов, возможно, включает нейтрализацию эффекта “упаковки” (эффект “упаковки” – увеличение степени повреждения эритроцитов при замораживании с высоким гематокритом по сравнению с низким) [22]. Замораживание в комбинированных криоконсервантах с проникающими и непроницающими криопротекторами может быть эффективным подходом для устранения эффекта “упаковки”.

Предполагается, что повреждение клеток из-за эффекта “упаковки” определяется механическими воздействиями в промерзающих каналах льда [15, 20] и приращением осмотических эффектов при плавлении внеклеточного и внутриклеточного льда [8, 11, 21, 23].

При быстром замораживании уменьшается время воздействия высоких концентраций растворенных веществ и не выявляется концентрирования клеток в каналах между растущими кристаллами льда. Однако в данных условиях имеет место отрицательное влияние высокой концентрации клеток. Поэтому был сделан вывод, что механизм эффекта “упаковки” при быстром замораживании отличается от такового при медленном [19].

Быстрое охлаждение повышает вероятность образования внутриклеточных кристаллов льда, прирост которых будет при замораживании эритроцитов с высоким гематокритом [21]. Предполагается, что механизм повреждения внутриклеточными кристаллами льда является осмотическим и реализуется при медленном размораживании [8]. В результате быстрого размораживания приращение повреждений в суспензии с высокой плотностью клеток происходит за счет

Combining non-penetrative polymer cryoprotectants with penetrative ones in freezing medium enables to reduce the concentration of the latter without changing the integrity and osmotic resistance in frozen cells [2, 3, 9]. In addition, the usage of combined cryoprotectants eliminates the need in cooling rate control [5, 26, 27]. This indicates to the presence of general causes of different cell damages, prevented by a combined cryoprotection with non-penetrative and penetrative cryoprotectants.

The usage of a combined cryopreservative hydroxyethylated starch (HES) + dimethyl sulfoxide (DMSO), compared to the medium, comprising only DMSO, results in a decrease of sample's overcooling extent at crystallisation moment [13, 27]. Freezing of suspension with a high cell concentration, compared to a low one, is assumed to result in a greater overcooling of samples [21]. These data point to the fact, that the mechanism of a cryoprotective effect of combined cryopreservatives possibly triggers the “packing” effect neutralisation (“packing” effect is an increase in erythrocyte damage extent under freezing with a high hematocrit, compared to a low one) [22]. Freezing with combined cryopreservatives, containing penetrative and non-penetrative cryoprotectants, may be an efficient approach in “packing” effect elimination.

Cell damaging due to the “packing” effect is assumed to be determined by mechanical effects in frozen ice channels [15, 20] and an increment of osmotic effects under extracellular and intracellular ice melting [8, 11, 21, 23].

Under rapid freezing the influence period of high-concentrated dissolved substances decreases and no cell concentrating in the channels between growing ice crystals is revealed. However under these conditions a negative effect of high cell concentration occurs. Therefore we concluded about the distinction of the “packing” effect mechanism under rapid freezing from that under slow one [19].

Rapid cooling augments the probability of intracellular ice crystal formation, which increment will occur under freezing erythrocytes with a high hematocrit [21]. The mechanism of damaging with intracellular ice crystals is assumed to be osmotic and realised under slow freeze-thawing [8]. As a result of rapid freeze-thawing an increment of damages in suspension with a high cell density occurs because of higher dilution of environment due to a rapid melting of extracellular ice, which significant part was formed from an intracellular water [11].

Thus, during a rapid freeze-thawing cycle of suspensions with a high cell concentration there is observed an osmotic effect rise under thawing.

The literature data show the “packing” effect as mainly studied in the glycerol or DMSO-containing media [7, 15, 21, 23, 28]. Therefore it is necessary to

большого разведения внешней среды вследствие быстрого плавления внеклеточного льда, значительная часть которого была образована из внутриклеточной воды [11].

Таким образом, в цикле быстрого замораживания-отогрева суспензий с высокой концентрацией клеток наблюдается увеличение осмотического воздействия на стадии отогрева.

Данные литературы показывают, что эффект “упаковки” исследовался в основном в средах, содержащих глицерин или ДМСО [7, 15, 21, 23, 28]. Поэтому необходимо выявить эффект “упаковки” при замораживании эритроцитов с непроницающими криопротекторами и влияние на него комбинарованных сред, которые дополнительно включают проникающие криопротекторы.

Цель работы – определить влияние непроницающих и проникающих криопротекторов, а также их комбинаций на эффект “упаковки” в солевой и сахарозо-солевой средах.

Материалы и методы

В работе использовали NaCl (х. ч.); сахарозу (ч. д. а.); полиэтиленгликоль (ПЭГ-1500) производства Merck; декстран с молекулярной массой 10000 производства Pharmacia Fine Chemicals; диметилсульфоксид (ДМСО) производства Sigma. Эритроциты человека получали из донорской крови четырехкратным отмыванием раствором, содержащим 0,15 М NaCl, 10 мМ трис, pH 7,4. Растворы криопротекторов в концентрациях 5–15% готовили на сахарозо-солевой среде, содержащей 50 мМ NaCl + 200 мМ сахарозы, или солевой среде, содержащей 0,15 М NaCl, которая включала 10 мМ трис, pH 7,4. Образцы эритроцитов в средах замораживания объемом 1 мл и гематокритами 0,8 или 40% в полиэтиленовых пробирках погружали в жидкий азот, выдерживали 15 мин, затем переносили на водяную баню при температуре 40°C на 3 мин (модель быстрого замораживания-отогрева). После отогрева образцы разводили соответствующими средами замораживания до гематокрита ~0,4% и центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин. Процент гемолиза вычисляли после спектрофотометрического определения оптической плотности надосадочной жидкости при длине волны 543 нм:

$$\text{процент гемолиза} = [A_1/A_2] \times 100,$$

где A_1 – оптическая плотность надосадочной жидкости экспериментального образца; A_2 – оптическая плотность при полном гемолизе контрольного образца.

Результаты представлены как среднее значение \pm среднее квадратическое отклонение. Для определения статистической достоверности ре-

find out the “packing” effect under erythrocyte freezing with non-penetrative cryoprotectants and the influence on them of combined media, which additionally comprise penetrative cryoprotectants.

The research was aimed to determine the effect of non-penetrative and penetrative cryoprotectants, as well as their combinations on the “packing” effect in saline and sucrose-saline media.

Materials and methods

In research there were used NaCl (chemically pure grade); sucrose (pure for analysis grade); polyethylene glycol (PEG-1500) (Merk); dextran with 10.000 molecular mass (Pharmacia Fine Chemicals); dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma). Human erythrocytes were derived from donor blood via a four-fold washing out with the solution, containing 0.15 M NaCl, 10 mM Tris, pH 7.4. Cryoprotective solutions in 5–15% concentrations were prepared with sucrose-saline medium, containing 50 mM NaCl + 200 mM sucrose or 0.15 M NaCl-containing saline solution, comprising 10 mM Tris, pH 7.4. Erythrocytes samples in 1 ml freezing media with 0.8 or 40% hematocrits in polyethylene vials were immersed into liquid nitrogen and kept for 15 min, then transferred on water bath at 40°C for 3 min (model of rapid freeze-thawing). After thawing the samples were diluted with the corresponding freezing media to ~0.4% hematocrit and centrifuged for 5 min at 3000 rot/min. Hemolysis percentage was calculated after spectrophotometrical determination of optical density of supernatant at 543 nm wavelength:

$$\text{hemolysis percentage} = [A_1/A_2] \times 100,$$

where A_1 is optical density of experimental sample's supernatant; A_2 is optical density under a complete hemolysis of the control sample.

The results are presented as the mean \pm mean square deviation. To determine the statistical significance of the results we used a non-parametric Mann-Whitney method at $p < 0.05$ ($n = 5$) [1].

Results and discussion

The research results, presented in Fig. 1, show freezing in isotonic sucrose-saline medium as revealing the difference of damage extent of erythrocytes for samples with low and high hematocrits (“packing” effect). An increase in NaCl concentration will result in a rise in erythrocyte hemolysis extent in the samples with low hematocrit and difference elimination between erythrocyte damages in the samples with low and high hematocrits (Fig. 1, medium 2). Including DMSO into the medium reduces the damage extent in erythrocytes with the “packing” effect revealing (Fig. 1, medium 3). The same results were obtained in saline media with PEG-1500 or dextran. In the media, comprising 5%

зультатов использовали непараметрический метод Манна-Уитни при $p < 0,05$ ($n = 5$) [1].

Результаты и обсуждение

Результаты исследования, представленные на рис. 1, показывают, что замораживание в изотонической сахарозо-солевой среде выявляет разницу степени повреждения эритроцитов для образцов с низким и высоким гематокритом (эффект “упаковки”). Если концентрацию NaCl повысить, то это приведёт к увеличению степени гемолиза эритроцитов в образцах с низким гематокритом и устранению разницы в повреждениях эритроцитов в образцах с низким и высоким гематокритом (рис. 1, среда 2). Включение в среду ДМСО уменьшает степень повреждения эритроцитов с выявлением эффекта “упаковки” (рис. 1, среда 3). Подобные результаты получены в солевых средах с ПЭГ-1500 или декстраном. В средах, содержащих 5% ПЭГ-1500 (рис. 1, среда 4) или 10% декстрана (рис. 1, среда 7), эффект “упаковки” не выявлен. Однако при повышении концентрации данных полимеров или включении в среду замораживания 5% ДМСО (рис. 1, среды 5, 8) степень повреждения эритроцитов в образцах, замороженных с низким и высоким гематокритом, существенно различается. Таким образом, эффект “упаковки” определяется количеством NaCl, концентрацией полимерных криопротекторов и наличием ДМСО в среде замораживания.

Возникает вопрос об использовании необходимого количества криопротекторов для устранения эффекта “упаковки”. Включение 5% ДМСО в изотоническую сахарозо-солевую среду достаточно для устранения данного эффекта (рис. 2, среда 4). Однако если сахарозо-солевая среда содержит большее количество NaCl, то включение в нее ДМСО, напротив, приводит к появлению эффекта “упаковки” (рис. 1, среда 3). Сравнение этих результатов указывает на то, что содержание NaCl в среде замораживания является существенным фактором для проявления и устранения эффекта “упаковки”. В то же время включение декстрана хотя и снижает степень повреждения, однако разница гемолиза эритроцитов в образцах с низким и высоким гематокритом остается (рис. 2, среды 7–11). Подобный результат был получен в сахарозо-солевой среде с количеством NaCl 0,15 моль/л при повышении концентрации декстрана с 10 (см. рис. 1, среда 7) до 15 % (см. рис. 1, среда 9), что усиливало проявление эффекта “упаковки”. Полученные данные указывают на то, что декстран не способен устранить эффект “упаковки” по сравнению с ДМСО.

Таким образом, устранение эффекта “упаковки” происходит после включения ДМСО в сахарозо-

PEG-1500 (Fig. 1, medium 4) or 10% dextran (Fig. 1, medium 7) no “packing” effect was revealed. However when increasing the concentrations of these polymers or including 5% DMSO into freezing medium (Fig. 1, media 5, 8) the damage extent of erythrocytes in the samples, frozen with low and high hematocrit significantly differs. Thus, the “packing” effect is determined by NaCl amount, concentration of polymer cryoprotectants and DMSO presence in freezing medium.

The question arises about using a necessary amount of cryoprotectants to eliminate “packing” effect. Including 5% DMSO into isotonic sucrose-saline solution is necessary for this effect elimination (Fig. 2, medium 4). However if sucrose-saline medium comprises a big amount of NaCl, then DMSO inclusion into it, in contrary, results in “packing” effect manifestation (Fig. 1, medium 3). Comparison of these results indicates to the NaCl content in freezing medium as a significant factor for “packing” effect manifestation and elimination. At the same time even if dextran inclusion reduces the damage extent, the difference of erythrocyte hemolysis in samples with low and high hematocrits is kept (Fig. 2, media 7–11). The similar result was obtained in sucrose-saline solution with 0.15 mol/l amount of NaCl, when increasing dextran concentration from 10 (see Fig. 1, medium 7) to 15% (see Fig. 1, medium 9), that strengthened the “packing” effect manifestation. The data obtained point to the fact, that dextran is not capable for eliminating “packing” effect compared to DMSO.

Thus, the elimination of “packing” effect occurs after including DMSO into sucrose-saline medium with NaCl concentration, being lower than isotonic one.

The question of “packing” effect elimination during freezing in the media, containing PEG-1500 or dextran and DMSO without sucrose, was studied.

The results demonstrated a slightly manifested “packing” effect in the media, containing 5% PEG-1500 or 10% dextran. If adding 5% DMSO into the mentioned media, a considerable difference in erythrocyte hemolysis in the samples, frozen with low and high hematocrits, was revealed. An increase in DMSO concentration up to 15% eliminates “packing” effect (Fig. 3). In this case bigger amount of DMSO, than in sucrose-containing medium and lower NaCl one is necessary (see Fig. 2).

Thus, the results obtained testify to a considerable role of medium ionic strength in manifestation and elimination of “packing” effect. Under physiological ionic strength (0.15 M/l NaCl) for this effect manifestation of need is to combine non-penetrative cryoprotectants with DMSO or augment PEG-1500 or dextran concentrations (see Fig. 1). If ionic strength is lower than physiological one (0.05 mol/l NaCl), the same combination of polymer cryoprotectants and

солевую среду с концентрацией NaCl ниже изотонической.

Исследован вопрос устранения эффекта “упаковки” при замораживании в средах, содержащих ПЭГ-1500 или декстран и ДМСО без сахарозы.

Результаты показали, что в средах, содержащих 5% ПЭГ-1500 или 10% декстрана, эффект “упаковки” проявлен слабо. Если в указанные среды включить 5% ДМСО, то выявляется существенная разница в гемолизе эритроцитов в образцах, замороженных с низким и высоким гематокритом. Повышение концентрации ДМСО до 15% устраняет эффект “упаковки” (рис. 3). В данном случае необходимо большее количество ДМСО, чем в среде, содержащей сахарозу, и меньшее количество NaCl (см. рис. 2).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о существенной роли ионной силы среды в проявлении и устранении эффекта “упаковки”. При физиологической ионной силе (0,15 моль/л NaCl) для проявления данного эффекта необходимо сочетание непроникающих криопротекторов с ДМСО или повышение концентрации ПЭГ-1500 или декстрана (см. рис. 1). Если ионная сила ниже физиологической (0,05 моль/л NaCl), то подобное сочетание полимерных криопротекторов и ДМСО достаточно для устранения эффекта “упаковки” (см. рис. 2). Однако при физиологической ионной силе необходимо большее количество ДМСО (рис. 3).

Эффект “упаковки” проявляется при замораживании эритроцитов в среде, содержащей 1–2 моль/л глицерина или ДМСО, а устраняется при повышении концентрации данных криопротекторов до 4 моль/л [7]. Эритроциты, замороженные в среде, содержащей 15–20% глицерина, являются осмотически неустойчивыми по сравнению с клетками, замороженными в среде с 40% глицерина (4,3 моль/л) [28]. Таким образом, данные литературы указывают на то, что устранение эффекта “упаковки” способствует поддержанию нормальных осмотических свойств замороженных эритроцитов и что для устранения данного эффекта необходима высокая концентрация проникающего криопротектора.

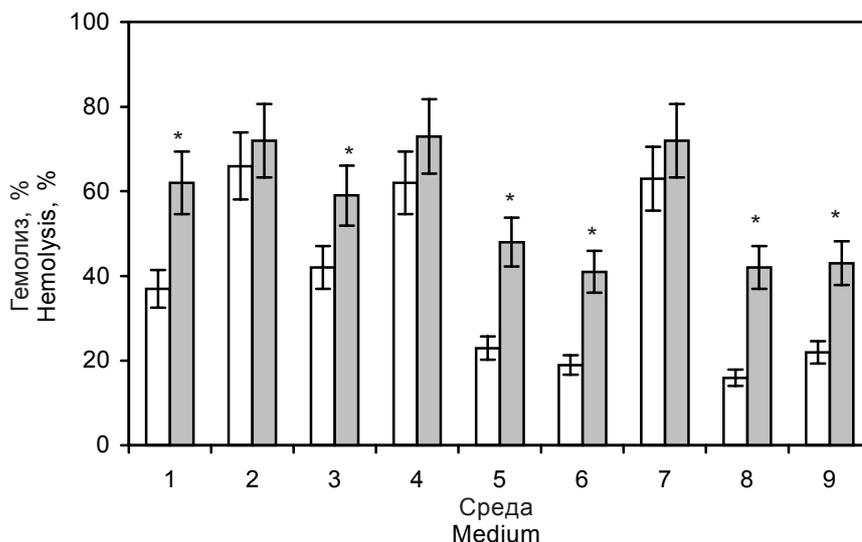


Рис. 1. Повреждение эритроцитов в цикле замораживания-отогрева в средах с проникающими и непроникающими криопротекторами с различным гематокритом (□ – 0,8%, ■ – 40%). Среда 1 содержит 50 ммоль/л NaCl + 200 ммоль/л сахарозы; среды 2–9 приготовлены на растворе, содержащем 0,15 моль/л NaCl; 2 – 200 ммоль/л сахарозы; 3 – 200 ммоль/л сахарозы + 5% ДМСО; 4 – 5% ПЭГ-1500; 5 – 5% ПЭГ-1500 + 5% ДМСО; 6 – 10% ПЭГ-1500; 7 – 10% декстрана; 8 – 10% декстрана + 5% ДМСО; 9 – 15% декстрана; * – результаты статистически достоверны по сравнению с соответствующими показателями степени повреждения при замораживании с гематокритом 0,8% ($p < 0,05$).

Fig. 1. Erythrocyte damage during freeze-thawing cycle in media with penetrative and non-penetrative cryoprotectants with different hematocrit (□ – 0.8%, ■ – 40%). Medium 1 comprises 50 mmol/l NaCl + 200 mmol/l sucrose; media 2–9 are prepared with solution, containing 0.15 mol/l NaCl; 2 – 200 mmol/l sucrose; 3 – 200 mmol/l sucrose + 5% DMSO; 4 – 5% PEG-1500; 5 – 5% PEG-1500 + 5% DMSO; 6 – 10% PEG-1500; 7 – 10% dextran; 8 – 10% dextran + 5% DMSO; 9 – 15% dextran; * – results are statistically significant compared to the corresponding indices of damage extent under freezing with hematocrit 0.8% ($p < 0.05$).

DMSO is sufficient for “packing” effect elimination (see Fig. 2). However under physiological ionic strength a higher DMSO number is required (Fig. 3).

“Packing” effect is manifested under erythrocyte freeze-thawing in 1–2 mol/l glycerol or DMSO-containing medium, and eliminated under concentration rise of these cryoprotectants up to 4 mol/l [7]. Erythrocytes, frozen in 15–20% glycerol-containing medium, are osmotically non-resistant compared to the cells, frozen in that with 40% glycerol (4.3 mol/l) [28]. Thus, the literature data indicate to the elimination of “packing” effect as contributing to the maintenance of normal osmotic properties of frozen erythrocytes and to a required high-concentrated penetrative cryoprotectant for eliminating this effect.

The research results demonstrate, that if the media comprise a non-penetrative and penetrative cryoprotectants, the concentration of the latter should be significantly lower to eliminate the “packing” effect. The presence of low concentrated penetrative cryoprotectants in freezing medium creates conditions to simplify the washing-out procedure for frozen erythrocytes. Of note is the fact, that if erythrocytes are in the medium with glycerol concentration not higher than

Результаты работы показывают, что если среды содержат непроникающий и проникающий криопротекторы, то последнего требуется значительно меньшая концентрация, чтобы устранить эффект “упаковки”. Присутствие в среде замораживания невысоких концентраций проникающих криопротекторов создает условия для упрощения отмывания замороженных эритроцитов. Следует отметить, что если эритроциты находятся в среде с концентрацией глицерина не выше 6%, то при их переносе в изотонический раствор NaCl не выявляется повышение осмотической хрупкости [4].

Анализ литературы показывает, что наиболее перспективным подходом для выявления эффективных способов замораживания и хранения различных клеток является подбор комбинированных криоконсервантов, которые включают проникающие и непроникающие полимерные криопротекторы [2, 3, 5, 10, 14, 24, 25, 29]. Во-первых, сочетание полимеров с 1,2-пропандиолом позволяет существенно снизить его концентрацию с 38 до 20% без уменьшения общей сохранности эритроцитов и их осмотической устойчивости [2, 3]. Во-вторых, использование комбинированных криоконсервантов (ГЭК+ДМСО) приводит к уменьшению степени переохлаждения клеточных образцов в зоне субнулевых температур [13, 27]. В-третьих, комбинирование проникающих и непроникающих криопротекторов упрощает процедуру замораживания [10, 14, 26, 27]. Сочетание в среде ДМСО и ГЭК при замораживании нефракционированного костного мозга устраняет необходимость использовать программный замораживатель и хранить клетки в жидком азоте [27]. Хранение образцов в замораживателе при -80°C обеспечивает необходимые количественные и качественные показания для трансплантации клеток после размораживания [26]. Комбинирование ДМСО и ГЭК позволяет исключить контроль скорости замораживания для гемопоэтических клеток кордовой крови [10], клеток поджелудочной железы [14] и стволовых клеток костного мозга [13]. Данные литературы указывают на то, что одной из положительных сторон эффективного действия комбинированных сред является дости-

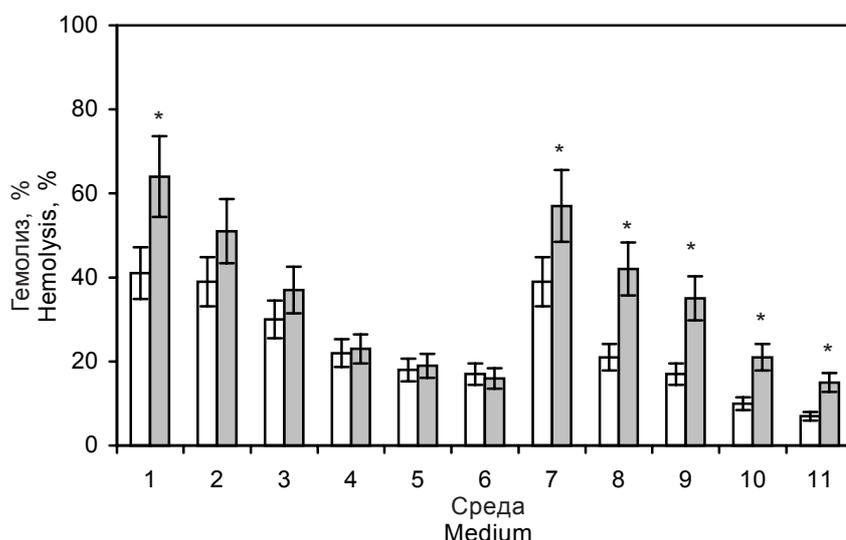


Рис. 2. Влияние различных концентраций ДМСО (среды 2–6) и декстрана (среды 7–11) на степень повреждения эритроцитов в цикле замораживания-отогрева в сахарозо-солевой среде (50 ммоль/л NaCl + 200 ммоль/л сахарозы) с различным гематокритом (□–0,8%, ■–40%): 1–0%; 2–1%; 3–3%; 4–5%; 5–7%; 6–9%; 7–3%; 8–5%; 9–10%; 10–15%; 11–20%; *– результаты статистически достоверны по сравнению с соответствующими показателями степени повреждения при замораживании с гематокритом 0,8% ($p < 0,05$).

Fig. 2. Effect of differently concentrated DMSO (media 2–6) and dextran (media 7–11) on damage extent of erythrocytes during freeze-thawing in sucrose-saline medium (50 mmol/l NaCl + 200 mmol/l sucrose) with different hematocrit (□–0.8%, ■–40%): 1–0%; 2–1%; 3–3%; 4–5%; 5–7%; 6–9%; 7–3%; 8–5%; 9–10%; 10–15%; 11–20%.

Note: * – results are statistically significant compared to the corresponding indices of damage extent under freezing with hematocrit 0.8% ($P < 0.05$).

6%, no increase in osmotic fragility is revealed, when transferring them into NaCl isotonic solution [4].

Literature data analysis shows the selection of combined cryopreservatives, comprising penetrative and non-penetrative polymer cryoprotectants, as the most perspective approach to reveal the efficient ways for freezing and storage of different cells [2, 3, 5, 10, 14, 24, 25, 29]. Firstly, the combination of polymers with 1,2-propanediol enables a considerable decrease in its concentration from 38 down to 20% without reducing a general integrity of erythrocytes and their osmotic resistance [2, 3]. Secondly, the usage of combined cryopreservatives (HES + DMSO) results in a decrease of overcooling extent of cell samples in subzero temperature zone [13, 27]. Thirdly, the combination of penetrative and non-penetrative cryoprotectants simplifies the freezing procedure [10, 14, 26, 27]. The combination of DMSO and HES in the medium during non-fractionated bone marrow freezing eliminates the necessity to use a programmable freezer and store cells in liquid nitrogen [27]. Sample storage in freezer at -80°C provides necessary quantitative and qualitative indices for cell transplantation after freeze-thawing [26]. Combining DMSO and HES enables excluding the control for freezing rate for cord blood hemopoietic cells [10], pancreas cells [14] and bone

жение оптимальной дегидратации клеток в зоне субнулевых температур. Установлено, что для упрощения процедуры замораживания и отмывания размороженных клеток необходимо использовать криоконсерванты с проникающими и непроникающими криопротекторами.

Объяснить эффективность комбинированных сред можно из имеющихся в литературе сведений о механизмах защитного и повреждающего действия непроникающих и проникающих криопротекторов. Предполагают, что защитные свойства полимеров связаны с их способностью изменять физическое состояние растворов в ходе замораживания и отогрева вследствие структурирования молекул воды и снижения температуры ее замерзания, а не из-за прямого действия на клеточную мембрану [6]. При замораживании, кроме защитного эффекта, непроникающие криопротекторы оказывают повреждающее действие вследствие наложения осмотического градиента, значительной дегидратации клеток и достижения ими критически минимального объема [17]. Криозащитное действие проникающих криопротекторов связано с их проникновением в клетки и замедлением дегидратации [18]. Кроме того, замедляется концентрирование внешней среды и ослабляется повреждающее действие “эффектов раствора” [16]. Однако “торможение” дегидратации клеток приводит к повышению вероятности формирования внутриклеточных кристаллов льда [18].

Таким образом, действие проникающих и непроникающих криопротекторов при замораживании всегда ослабляется сопутствующими отрицательными эффектами. Для устранения отрицательного действия криопротекторов возможны следующие подходы. Во-первых, если в среду замораживания с непроникающим криопротектором включить проникающий, то это должно уменьшить степень дегидратации клеток и устранить их критическое сжатие. Во-вторых, если в среде замораживания проникающий криопротектор основной, то включение непроникающего криопротектора должно устранить излишнее замедление дегидратации. Вероятно, в этих случаях произойдет сужение границ изменения объема клеток в цикле замораживания-отогрева. Известно, что

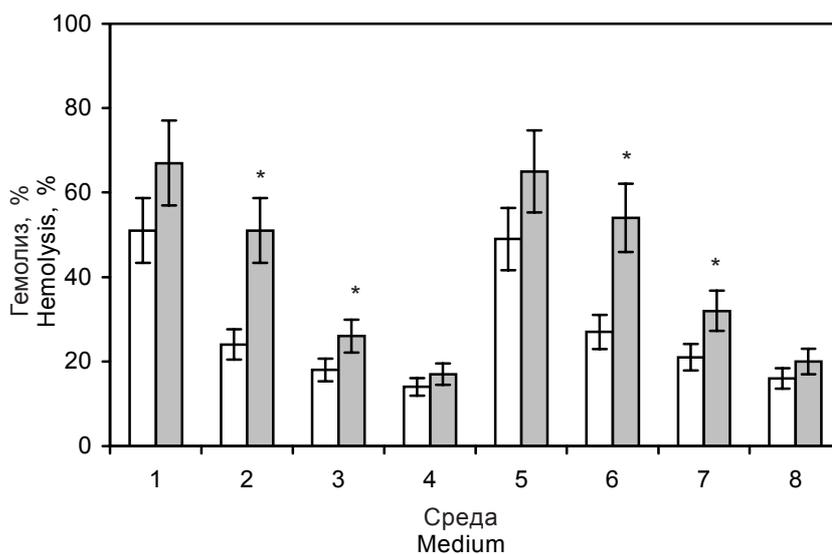


Рис. 3. Влияние различных концентраций ДМСО (1 и 5 – 0%; 2 и 6 – 5%; 3 и 7 – 10%; 4 и 8 – 15%) на степень повреждения эритроцитов в цикле замораживания-отогрева в солевой среде (0,15 моль/л NaCl), содержащей: 5% ПЭГ-1500 (среды 1–4) или 10% декстрана (среды 5–8) с различным гематокритом (□ – 0,8%, ■ – 40%); * – результаты статистически достоверны по сравнению с соответствующими показателями степени повреждения при замораживании с гематокритом 0,8% ($P < 0,05$).

Fig. 3. Effect of differently concentrated DMSO (1 and 5 – 0%; 2 and 6 – 5%; 3 and 7 – 10%; 4 and 8 – 15%) on damage extent of erythrocytes during freeze-thawing in saline medium (0.15 mol/l NaCl), containing: 5% PEG-1500 (media 1–4) or 10% dextran (media 5–8) with different hematocrit (□ – 0.8%, ■ – 40%); * – results are statistically significant compared to the corresponding indices of damage extent under freezing with hematocrit 0.8% ($P < 0.05$).

marrow stem cells [13]. Literature data show the achievement of optimal cell dehydration in subzero temperature area to be one of the positive aspects of efficient effect of combined media. It was established the necessity in using cryopreservatives with penetrative and non-penetrative cryoprotectants to simplify the freezing and washing-out procedures for frozen-thawed cells.

It is possible to explain the efficiency of combined medium by proceeding from the present literature data about the mechanisms of protective and damaging effects of non-penetrative and penetrative cryoprotectants. Protective properties of polymers are suggested as associated to their capability for changing physical state of solutions during freeze-thawing due to water molecule structuring and its freezing temperature decrease, but not a direct effect on cell membrane [6]. In addition to a protective effect, the non-penetrative cryoprotectants cause a damaging effect under freezing due to an osmotic gradient application, considerable cell dehydration and achieving a critically maximal cell volume [17]. Cryoprotective effect of penetrative cryoprotectants is associated to their penetration through cells and dehydration slowing down [18]. In addition, the environment concentrating is slowed down and a damaging action of “solution effects” is weakened [16]. However the “inhibition”

степень сжатия и регидратации для достижения осмотического равновесия при субнулевых температурах является существенным фактором в повреждении эритроцитов при замораживании [12].

Если имеет место сужение границ изменения объема клеток при замораживании-отогреве в комбинированных криоконсервантах, то это также приведет к ослаблению флуктуационно-осмотического механизма повреждения клеток при размораживании. При этом повреждение внутриклеточным льдом не механическое, а осмотическое, которое реализуется при размораживании. Замороженные клетки различаются содержанием в них количества льда, при отогреве которых образуются движущие силы для флуктуационного выхода и входа воды и большей вероятности повреждения тех клеток, в которых на конечной стадии размораживания остаются кристаллы льда [8]. Если комбинированный криоконсервант ограничивает изменение объема клеток в цикле замораживания-отогрева, то описанный повреждающий механизм будет блокирован.

Таким образом, анализ данных литературы, касающихся особенностей защитного и повреждающего действия непроникающих и проникающих криопротекторов, позволяет сделать предположение относительно эффективности использования комбинированных криоконсервантов: исследуемые среды при замораживании обеспечивают оптимальную дегидратацию клеток и сужают границы изменения их объема в цикле замораживания-отогрева, что обеспечивает устойчивость клеток к осмотическим воздействиям.

Известно, что эффект “упаковки” определяется общепринятыми механизмами повреждения клеток при замораживании: “эффекты раствора” и внутриклеточное замерзание [21], а также повреждения, связанные с деформацией клеток в промерзающих каналах льда [15]. Исследование эффекта “упаковки” в зависимости от концентрации глицерина, скоростей замораживания и отогрева показало, что эффект наиболее выражен при концентрации глицерина 1–2 моль/л и медленных скоростях охлаждения и отогрева [22]. При концентрации глицерина 3–4 моль/л эффект “упаковки” устраняется [7] и замороженные эритроциты имеют нормальную осмотическую хрупкость [28].

Полученные результаты показывают, что эффект “упаковки” выявляется в изотонической сахарозо-солевой среде при отсутствии и в присутствии полимерных криопротекторов (ПЭГ-1500, декстран) и в солевой среде, содержащей полимеры. Установлено, что для устранения эффекта “упаковки” необходимо сочетание в среде замораживания проникающих и непроникающих защитных компонентов. В солевой среде с ПЭГ-1500 или

of cell dehydration results in a rise of probability of intracellular ice crystal formation [18].

Thus, the effect of penetrative and non-penetrative cryoprotectants during freezing is also weakened by accompanying negative effects. In order to eliminate a negative cryoprotective effect the following approaches are possible. First, if including a penetrative cryoprotectant into the freezing medium with a non-penetrative one, this should reduce the extent of cell dehydration and eliminate their critical shrinkage. Secondly, if a penetrative cryoprotectant is principal in freezing medium, the inclusion of a non-penetrative one should eliminate a surplus slowing down of dehydration. It is obviously, that in these cases there will occur the narrowing of boundaries of cell volume change during freeze-thawing cycle. The extent of shrinkage and rehydration to get an osmotic balance under subzero temperatures is known to be a significant factor in erythrocyte damaging under freezing [12].

If a narrowing of boundaries of cell volume change under freeze-thawing with combined cryopreservatives occurs, this will also result in a weakening of fluctuation and osmotic mechanism of cell damaging under freeze-thawing. At the same time the damage by intracellular ice is not mechanical, but osmotic, which is realised under freeze-thawing. Frozen cells differ by an ice content in them, during thawing of which there are formed the active forces for a fluctuation water entering and release and a high probability of damaging in those cells, where ice crystals remain at a final stage of freeze-thawing [8]. If a combined cryopreservative limits the cell volume change during freeze-thawing cycle, the described damaging mechanism will be blocked.

Thus, the analysis of literature data, related to the peculiarities of protective and damaging effects of non-penetrative and penetrative cryoprotectants enables suggesting about an efficient usage of combined cryopreservatives: studied media during freezing provide the optimal cell dehydration and narrow boundaries of their volume change within freeze-thawing cycle, by providing cell resistance to osmotic effects.

The “packing” effect is known as determined by the standard mechanisms of cell damaging under freezing: “solution effects” and intracellular freezing [21], as well as damages, associated to cell deformation into frozen ice channels [15]. Study of “packing” effect depending on glycerol concentration, freezing and thawing rates demonstrated the effect as the most pronounced at 1–2 mol/l glycerol concentration and slow cooling and thawing rates [22]. Under 3–4 mol/l glycerol concentration the “packing” effect is eliminated [7] and frozen erythrocytes have a normal osmotic fragility [28].

The results obtained show the “packing” effect as revealed in isotonic sucrose-saline solution both at the

декстраном необходимо использовать 15% ДМСО (рис. 3), в сахарозо-солевой среде с полимерами или без них – 5% ДМСО (см. рис. 1, 2). Протектирующий эффект сахарозы проявляется на стадии отогрева и когда она находится в ресуспендирующем растворе [30]. Это указывает на существенную роль сахарозы как осмотического стабилизатора в устранении эффекта “упаковки” и соответственно на то, что в условиях замораживания-отогрева осмотический механизм повреждения на стадии размораживания вносит весомый вклад в данный эффект.

При быстром охлаждении вероятность вклада механического повреждения эритроцитов в смыкающихся каналах льда в эффект “упаковки” незначительна, так как клетки в основном равномерно распределены в массе льда [19]. Вероятно, механизм проявления эффекта “упаковки” связан в большей степени не с этапом охлаждения, а быстрого отогрева. Выдерживание клеток при субнулевых температурах приводит к нескольким эффектам [8]: протекция к последующему быстрому охлаждению (-196°C) и отогреву, повреждение при температуре выдерживания. Повреждение клеток, которые охлаждаются до -196°C , связано с количеством внутриклеточного льда, который образуется при охлаждении. При этом протекция определяется дегидратацией клеток при температуре выдерживания, которая способствует исключению внутриклеточного замерзания в ходе последующего охлаждения (-196°C). Повреждение при температуре выдерживания может быть результатом прямого эффекта высокой ионной силы или непрямого эффекта этого воздействия, связанного с повышением чувствительности клеток к осмотическому стрессу в ходе размораживания. На основании анализа результатов исследования было сделано предположение о существовании осмотического механизма повреждения клеток в ходе размораживания, когда клетки содержат неодинаковое количество льда [8]. Однако повреждение таким механизмом более вероятно при медленных скоростях размораживания.

При замораживании клеток с низким гематокритом вклад внутриклеточной воды во внеклеточный лед незначителен, а с высоким гематокритом существенен. В условиях быстрого отогрева на конечной стадии размораживания клеточных суспензий с высокой концентрацией клетки подвергаются гипотоническому стрессу вследствие быстрого таяния внеклеточного льда, значительная часть которого была образована из внутриклеточной воды [11]. Описанный механизм повреждения вероятен в цикле быстрого замораживания-отогрева суспензий эритроцитов с высоким гематокритом в среде, содержащей такие непроницающие криопротекторы, как сахароза или полимеры.

presence and absence of polymer cryoprotectants (PEG-1500, dextrans) and polymer-containing saline medium. Combining penetrative and non-penetrative protective components was established to be necessary for “packing” effect elimination. In saline medium with PEG-1500 or dextran it is necessary to use 15% DMSO (Fig. 3) and 5% DMSO in sucrose-saline medium with polymers or without them (see Fig. 1, 2). Protective effect of sucrose is manifested at thawing stage and when being in a resuspending solution as well [30]. This points to a significant role of sucrose as an osmotic stabiliser in eliminating “packing” effect and consequently to a significant contribution of an osmotic mechanism of damage under freeze-thawing conditions at freeze-thawing stage.

Under a rapid cooling a probable contribution of mechanical erythrocyte damage in adjoining ice channels into the “packing” effect is insignificant, since cells are mostly uniformly distributed into ice mass [19]. Probably, the mechanism of “packing” effect manifestation is mostly associated not to cooling stage, but a rapid thawing one. Cell exposure under subzero temperatures results in some effects [8]: protection to the following rapid cooling (-196°C) and thawing, a damage under exposure temperature. Damage of cells, cooled down to -196°C is associated to a number of intracellular ice, formed during cooling. At the same time the protection is determined by cell dehydration at exposure temperature, contributing to excluding intracellular freezing during following cooling (-196°C). The damage at exposure temperature may result from a direct effect of high ionic strength or indirect effect of this influence, associated to a rise of cell sensitivity to osmotic stress during freeze-thawing. Basing on the analysis of research results we assumed the presence of osmotic mechanism of cell damage during freeze-thawing, when cells contain unequal ice amount [8]. However the damage by such a mechanism is more probable under slow rates of freeze-thawing.

Under cell freezing with low hematocrit the contribution of intracellular water into extracellular ice is insignificant, but with high hematocrit it is considerable. Under rapid thawing at a final stage of freeze-thawing of highly concentrated cell suspensions the cells are subjected to hypotonic stress due to a rapid melting of extracellular ice, which significant part was formed from intracellular water [11]. The described damage mechanism is probable during rapid freeze-thawing cycle of erythrocyte suspensions with high hematocrit in the medium, comprising such non-penetrative cryoprotectants as sucrose and polymers.

The analysis of the results obtained and literature data enables assuming the combination of penetrative and non-penetrative cryoprotectants as contributing to correct a cryoprotective activity of the latter towards positive side due to a weakening of osmotic stress under freezing, which superposes by concentrating a non-

Анализ полученных результатов и данных литературы позволяет предположить, что комбинирование в среде замораживания проникающего криопротектора с непроникающим способствует коррекции криопротекторной эффективности последнего в положительную сторону вследствие ослабления осмотического стресса при замораживании, который налагается концентрированием непроникающего криопротектора. В данной ситуации имеет место предотвращение достижения клетками критически минимального объема, поэтому барьерная функция мембран не должна нарушаться. Такие клетки способны выдерживать гипотонический стресс на конечной стадии быстрого размораживания, который является причиной проявления эффекта “упаковки” в цикле быстрого замораживания-отогрева.

Выводы

1. В условиях быстрого замораживания-отогрева в солевой среде с ПЭГ-1500 или декстраном, а также в изоосмотической сахарозо-солевой среде выявляется различие степени повреждения эритроцитов в образцах с низким и высоким гематокритом (эффект “упаковки”).

2. Включение в солевую среду с полимерами ДМСО в концентрации 15% приводит к устранению эффекта “упаковки”. В то же время при замораживании в изоосмотической сахарозо-солевой среде достаточно 5% ДМСО для устранения данного эффекта.

3. Полученные данные показывают, что проявление и устранение эффекта “упаковки” зависят от соотношения в среде замораживания NaCl, проникающих и непроникающих криопротекторов. Чем выше ионная сила среды, тем большая концентрация проникающего криопротектора необходима для устранения эффекта “упаковки”.

Литература

1. Ашмарин И.П., Васильев И.П., Амбросов В.А. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов.– Л., 1975.– 76 с.
2. Межидов С.Х., Беляева И.М., Воротилин А.М., Моисеев В.А. Влияние сочетания поливинилпирролидона и 1,2-пропандиола на сохранность эритроцитов при криоконсервировании // Пробл. криобиологии.– 1996.– №2.– С. 22–25.
3. Межидов С.Х., Моисеев В.А. Влияние сочетания высокомолекулярных криопротекторов с 1,2-пропандиолом на сохранность эритроцитов при криоконсервировании// Пробл. криобиологии.– 1995.– №3.– С. 46–48.
4. Михнович Е.П., Рождественская М.А., Недельский Г.Т. Криоконсервация эритроцитов при –196°С с проникающими и непроникающими веществами// Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины.– Киев: Наук. думка, 1974.– С. 161–164.

penetrative one. In this case the achieving of a critically minimum volume by cells is prevented, therefore a barrier function of membranes should not be disordered. These cells are capable to survive a hypotonic stress at a final stage of rapid freeze-thawing, which is the reason of “packing” effect manifestation during freeze-thawing cycle.

Conclusions

1. Under rapid freeze-thawing in saline medium with PEG-1500 or dextran, as well as in isoosmotic sucrose-saline one there is found out the difference of damage extent of erythrocytes in the samples with low and high hematocrits (“packing” effect).

2. Including 15% DMSO into saline medium with polymers results in “packing” effect elimination. At the same time during freezing in isoosmotic sucrose-saline medium 5% DMSO is sufficient for this effect elimination.

3. The data obtained show the manifestation and elimination of “package” effect to be dependent on NaCl, penetrative and non-penetrative cryoprotectant ratio in freezing medium. The higher is the medium ionic strength, the bigger concentration of penetrative cryoprotectant is required to eliminate “packing” effect.

References

1. Ashmarin I.P., Vasiliev I.P., Ambrosov V.A. Rapid methods of statistical processing and experiment planning.– Leningrad: 1975.– 76 p.
2. Mezhdov S.Kh., Belyaeva I.M., Vorotilin A.M., Moiseyev V.A. Effect of a combination of polyvinyl pyrrolidone and 1,2-propanediol on the survival of RBC during cryopreservation // Problems of Cryobiology.– 1996.– N2.– P. 22–25.
3. Mezhdov S.Kh., Moiseyev V.A. Effect of combined treatment by highly molecular cryoprotectants and 1,2-propanediol on survival of red blood cells during cryopreservation // Problems of Cryobiology.– 1995.– N3.– P. 46–48.
4. Mikhnovich E.P., Rozhdestvenskaya M.A., Nedel'sky G.T. Erythrocyte cryopreservation at –196°С with penetrative and non-penetrative substances // Actual questions of cryobiology and cryomedicine.– Kiev: Nauk. dumka, 1974.– P. 161–164.
5. Clapissou G., Salinas C., Malacher P. et al. Cryopreservation with hydroxyethylstarch (HES) + dimethylsulphoxide (DMSO) gives better results than DMSO alone// Bull Cancer.– 2004.– Vol. 91, N4.– P. E97–102.
6. Connor W., Ashwood-Smith M.J. Cryoprotection of mammalian cells in tissue culture with polymers; possible mechanisms// Cryobiology.–1973.– Vol. 10, N6.– P. 488–496.
7. Dalgliesh R.J. Effect of an interaction between haematocrit and cryoprotectant concentration on freeze-thaw haemolysis of bovine erythrocytes// Cryobiology.–1976.–Vol. 13, N2.–P. 254–257.
8. Farrant J., Walter C.A., Lee H., McGann L.E. Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing// Cryobiology.–1977.– Vol. 14, N4.– P. 273–286.

5. *Clapisson G., Salinas C., Malacher P. et al.* Cryopreservation with hydroxyethylstarch (HES) + dimethylsulphoxide (DMSO) gives better results than DMSO alone// *Bull Cancer.*– 2004.– Vol. 91, N4.– P. E97–102.
6. *Connor W., Ashwood-Smith M.J.* Cryoprotection of mammalian cells in tissue culture with polymers; possible mechanisms// *Cryobiology.*–1973.– Vol. 10, N6.– P. 488–496.
7. *Dalgliesh R.J.* Effect of an interaction between haematocrit and cryoprotectant concentration on freeze-thaw haemolysis of bovine erythrocytes// *Cryobiology.*–1976.–Vol. 13, N2.–P. 254–257.
8. *Farrant J., Walter C.A., Lee H., McGann L.E.* Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing// *Cryobiology.*–1977.– Vol. 14, N4.– P. 273–286.
9. *Lionetti F.J., Hunt S.M., Gore J.M., Curby W.A.* Cryopreservation of human granulocytes// *Cryobiology.*–1975.–Vol. 12, N3.– P. 181–191.
10. *Liu K.Y., Dong W.C., Wang Y.L. et al.* Study on non-programmed process using dimethyl sulfoxide and hydroxyethyl starch as cryoprotectants in cryopreservation of cord blood hematopoietic cells // *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.*– 2004.–Vol. 12, N5.– P. 670–673.
11. *Levin R.L.* The limiting effects of heat and mass transfer on the osmotic behavior of cells during freezing and thawing // *Cryobiology.*–1982.–Vol. 19, N6.– P. 669.
12. *Leibo S.P.* Freezing damage of bovine erythrocytes: Simulation using glycerol concentration changes at subzero temperatures // *Cryobiology.*–1976.–Vol. 13, N6.– P. 587–598.
13. *Luo K., Wu G., Wang Q. et al.* Effect of dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch in the preservation of fractionated human marrow cells // *Cryobiology.*–1994.– Vol. 31, N4.– P. 349–354.
14. *Maruyama M., Kenmochi T., Sakamoto K. et al.* Simplified method for cryopreservation of islets using hydroxyethyl starch and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants// *Transplant. Proc.*– 2004.– Vol. 36, N4.– P. 1133–1134.
15. *Mazur P., Cole K.W.* Influence of cell concentration on the contribution of unfrozen fraction and salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes// *Cryobiology.*–1985.– Vol.22, N6.– P. 509–336.
16. *Meryman H.T.* Cryoprotective agents// *Cryobiology.*– 1971.– Vol. 8, N2.– P.173–183.
17. *Meryman H.T.* Osmotic stress as a mechanism of freezing injury// *Cryobiology.*–1971.– Vol. 8, N5.– P. 489–500.
18. *Morris G.J., Farrant J.* Interactions of cooling rate and protective additive on the survival of washed human erythrocytes frozen to –196 degrees C // *Cryobiology.*–1972.–Vol. 9, N3.– P. 173–181.
19. *Nei T.* Effect of initial of cell concentration of the post-thaw hemolysis of frozen erythrocytes // *Cryobiology.*– 1976.– Vol. 13, N6.– P. 651.
20. *Nei T.* Mechanism of hemolysis of erythrocytes by freezing at near-zero temperatures. 2. Investigations of factors affecting hemolysis by freezing // *Cryobiology.*–1968.– Vol. 4, N4.– P. 303–308.
21. *Pegg D.E.* The effect of cell concentration on the recovery of human erythrocytes after freezing and thawing in the pre-sence of glycerol // *Cryobiology.*–1981.– Vol. 18, N3.– P. 221–228.
22. *Pegg D.E., Diaper M.P.* The packing effect in erythrocyte freezing // *Cryo-Letters.*–1983.– Vol.4, N2.– P. 129–136.
23. *Pegg D.E., Diaper M.P., Skaer H.L., Hunt C.J.* The effect of cooling rate and warming rate on the packing effect in human erythrocytes frozen and thawed in the presence of 2 M glycerol // *Cryobiology.*–1984.–Vol. 21, N5.– P. 491–502.
24. *Reiners B., Zintl F., Plenert W.* Use of human albumin as an additional cryoprotective agent in freeze preservation of hematopoietic stem cells // *Folia Haematol Int Mag Klin. Morphol. Blutforsch.*–1987.– Vol. 114, N2.– P. 264–272.
9. *Lionetti F.J., Hunt S.M., Gore J.M., Curby W.A.* Cryopreservation of human granulocytes// *Cryobiology.*–1975.–Vol. 12, N3.– P. 181–191.
10. *Liu K.Y., Dong W.C., Wang Y.L. et al.* Study on non-programmed process using dimethyl sulfoxide and hydroxyethyl starch as cryoprotectants in cryopreservation of cord blood hematopoietic cells // *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.*– 2004.–Vol. 12, N5.– P. 670–673.
11. *Levin R.L.* The limiting effects of heat and mass transfer on the osmotic behavior of cells during freezing and thawing // *Cryobiology.*–1982.–Vol. 19, N6.– P. 669.
12. *Leibo S.P.* Freezing damage of bovine erythrocytes: Simulation using glycerol concentration changes at subzero temperatures // *Cryobiology.*–1976.–Vol. 13, N6.– P. 587–598.
13. *Luo K., Wu G., Wang Q. et al.* Effect of dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch in the preservation of fractionated human marrow cells // *Cryobiology.*–1994.– Vol. 31, N4.– P. 349–354.
14. *Maruyama M., Kenmochi T., Sakamoto K. et al.* Simplified method for cryopreservation of islets using hydroxyethyl starch and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants// *Transplant. Proc.*– 2004.– Vol. 36, N4.– P. 1133–1134.
15. *Mazur P., Cole K.W.* Influence of cell concentration on the contribution of unfrozen fraction and salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes// *Cryobiology.*–1985.– Vol.22, N6.– P. 509–336.
16. *Meryman H.T.* Cryoprotective agents// *Cryobiology.*– 1971.– Vol. 8, N2.– P.173–183.
17. *Meryman H.T.* Osmotic stress as a mechanism of freezing injury// *Cryobiology.*–1971.– Vol. 8, N5.– P. 489–500.
18. *Morris G.J., Farrant J.* Interactions of cooling rate and protective additive on the survival of washed human erythrocytes frozen to –196 degrees C // *Cryobiology.*–1972.–Vol. 9, N3.– P. 173–181.
19. *Nei T.* Effect of initial of cell concentration of the post-thaw hemolysis of frozen erythrocytes // *Cryobiology.*– 1976.– Vol. 13, N6.– P. 651.
20. *Nei T.* Mechanism of hemolysis of erythrocytes by freezing at near-zero temperatures. 2. Investigations of factors affecting hemolysis by freezing // *Cryobiology.*–1968.– Vol. 4, N4.– P. 303–308.
21. *Pegg D.E.* The effect of cell concentration on the recovery of human erythrocytes after freezing and thawing in the pre-sence of glycerol // *Cryobiology.*–1981.– Vol. 18, N3.– P. 221–228.
22. *Pegg D.E., Diaper M.P.* The packing effect in erythrocyte freezing // *Cryo-Letters.*–1983.– Vol.4, N2.– P. 129–136.
23. *Pegg D.E., Diaper M.P., Skaer H.L., Hunt C.J.* The effect of cooling rate and warming rate on the packing effect in human erythrocytes frozen and thawed in the presence of 2 M glycerol // *Cryobiology.*–1984.–Vol. 21, N5.– P. 491–502.
24. *Reiners B., Zintl F., Plenert W.* Use of human albumin as an additional cryoprotective agent in freeze preservation of hematopoietic stem cells // *Folia Haematol Int Mag Klin. Morphol. Blutforsch.*–1987.– Vol. 114, N2.– P. 264–272.
25. *Rowley S.D., Feng Z., Chen L. et al.* A randomized phase III clinical trial of autologous blood stem cell transplantation comparing cryopreservation using dimethylsulfoxide vs dimethylsulfoxide with hydroxyethylstarch// *Bone Marrow Transplant.*– 2003.– Vol. 31, N11.– P. 1043–1051.
26. *Stiff P.J., Koester A.R., Weidner M.K. et al.* Autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch without controlled-rate freezing// *Blood.*–1987.– Vol. 70, N4.– P. 974–978.
27. *Stiff P.J., Murgu A.J., Zaroulis C.G. et al.* Unfractionated human marrow cell cryopreservation using dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch// *Cryobiology.*–1983.–Vol. 20, N1.– P. 17–24.

25. Rowley S.D., Feng Z., Chen L. et al. A randomized phase III clinical trial of autologous blood stem cell transplantation comparing cryopreservation using dimethylsulfoxide vs dimethylsulfoxide with hydroxyethylstarch// Bone Marrow Transplant.– 2003.– Vol. 31, N11.– P. 1043–1051.
26. Stiff P.J., Koester A.R., Weidner M.K. et al. Autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch without controlled–rate freezing// Blood.–1987.– Vol. 70, N4.– P. 974–978.
27. Stiff P.J., Murgo A.J., Zaroulis C.G. et al. Unfractionated human marrow cell cryopreservation using dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch// Cryobiology.–1983.–Vol. 20, N1.– P. 17–24.
28. Wagner C.T., Burnett M.B., Livesey S.A., Connor J. Red blood cell stabilization reduces the effect of cell density on recovery following cryopreservation // Cryobiology.–2000.–Vol. 41, N3.–P. 178–194.
29. Wagner C.T., Martowicz M.L., Livesey S.A., Connor J. Biochemical stabilization enhances red blood cell recovery and stability following cryopreservation // Cryobiology.– 2002.– Vol. 45, N2.– P. 153–166.
30. Woolgar A.E. Hemolysis of human red blood cells by freezing and thawing in solutions containing sucrose: relationship with posthypertonic hemolysis and solute movements // Cryobiology.–1974.– Vol. 11, N1.– P. 44–51.

Accepted in 14.07.2008

Поступила 14.07.2008