

... КРІОБІОЛОГІЯ ... CRYOBIOLOGY ...

УДК: 612.111:547.422

**Исследование сохранности эритроцитов в зависимости от состава криозащитной среды на основе непроникающего криопротектора оксиэтилированного метилцеллозолява
А.В.Николенко, О.В.Вязовская**

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)
cryo@online.kharkiv.ua*

Изучено криозащитное действие композиционных сред на основе непроникающего криопротектора оксиэтилированного метилцеллозолява со степенью полимеризации $n=33-35$ (ОЭМЦ) при замораживании эритроцитов. Выявлена выраженная зависимость сохранности эритроцитов от состава среды: концентрации криопротектора, содержания NaCl и от соотношения концентраций электролита (NaCl) и неэлектролитов (углеводов). Установлено, что уменьшение концентрации криопротектора с 30% до 20%, а также снижение концентрации NaCl при его замещении на неэлектролиты, в качестве которых были использованы глюкоза, маннит и сахароза, способствует повышению эффективности разработанных криозащитных сред на основе ОЭМЦ.

Ключевые слова: эритроциты, криопротекторы, оксиэтилированный метилцеллозолев, калий, осмотическая хрупкость, гемолиз, гематокрит.

**Дослідження збереження еритроцитів у залежності від складу криозахисного середовища на основі непроникаючого криопротектора оксиетильованого метилцеллозолява
О.В.Ніколенко, О.В.В'язовська**

Вивчена криозахисна дія композиційних середовищ на основі непроникаючого криопротектора оксиетильованого метилцеллозолява зі ступенем полімеризації $n=33-35$ (ОЕМЦ) при заморожуванні еритроцитів. Виявлена виражена залежність збереженості еритроцитів від складу середовища: концентрації криопротектора, вмісту NaCl та від співвідношення концентрацій електроліту (NaCl) та неелектролітів (вуглеводів). Встановлено, що зменшення концентрації криопротектора з 30% до 20%, а також зниження концентрації NaCl при його заміщенні на неелектроліти, у якості яких були використані глюкоза, маніт і сахароза, сприяють підвищенню ефективності розроблених криозахисних середовищ на основі ОЕМЦ.

Ключові слова: еритроцити, криопротектори, оксиетильований метилцеллозолев, калій, осмотична крихкість, гемолиз, гематокрит.

**Study of red blood cells preservation depending on the composition of cryoprotective medium based on non-penetrating cryoprotectant oxyethylated methyl cellosolve
A.V.Nikolenko, O.V.Vyazovska**

The cryoprotective action of the composite mediums based on non-penetrating cryoprotectant oxyethylated methyl cellosolve with degree of polymerization $n=33-35$ (OEMC) after freezing of red blood cells has been investigated. The expressed dependence of their preservation on the medium composition has been shown: on concentration of cryoprotectant, content of NaCl and the ratio of the electrolyte (NaCl)/nonelectrolytes (carbohydrates) content. It is stated that decrease of the cryoprotectant concentration from 30% to 20% as well as reduction in NaCl concentration by replacing it by nonelectrolytes such as glucose, mannitol and sucrose enhances efficiency of the developed cryoprotective mediums based on OEMC.

Key words: red blood cells, cryoprotectants, oxyethylated methyl cellosolve, potassium, osmotic fragility, hemolysis, hematocrit.

Введение

Важным фактором, влияющим на фазово-структурное состояние плазматической мембраны, наряду с температурой, является осмотичность среды (Поздняков, 1988). Вклад в показатель осмолярности вносят составляющие криозащитной среды, в частности электролиты и неэлектролиты, от которых в значительной степени зависит сохранность клеток после замораживания-отогрева. Чувствительность клеток к изменениям осмотических и температурных параметров среды контролируется процессами, сопряженными с изменениями объема клеток. Значение осмолярности в системе эритроциты/криозащитная среда определяется как составом среды, так и взаимодействием ее компонентов с мембранными структурами. В связи с этим перспективным направлением повышения эффективности криозащитной среды является ее модификация со смещением баланса электролиты/неэлектролиты. В работах (Nandhini, Anuradha, 2003; Quan et al., 2009) было показано, что введение в среду углеводных добавок повышает криоустойчивость эритроцитов.

Известно, что одним из основных принципов действия высокомолекулярных криопротекторов является дегидратация клеток на этапе экспозиции, которая значительно влияет на их сохранность после замораживания. Выход воды из клетки снижает внутриклеточную кристаллизацию. Тем не менее, в процессе обезвоживания клеток повышается осмолярность внутриклеточной среды, что ведет к повреждению ее компонентов, латентным повреждениям плазматической мембраны, снижению барьерных функций, а это, в свою очередь, снижает устойчивость клеток к замораживанию. Разработка криозащитных сред на основе непроникающих криопротекторов остается актуальной, т.к. при этом не требуется отмывания криопротекторов, что значительно упрощает процедуру замораживания-отогрева.

Оксиэтилированные производные ряда полиолов (этиленгликоля, глицерина) заслуживают внимания как высокомолекулярные непроникающие вещества, на основе которых возможна разработка эффективных многокомпонентных сред для низкотемпературного консервирования эритроцитов человека. В работах (Пушкаръ и др., 1978; Белоус, Грищенко, 1994; Животова и др., 2007) было показано, что производные соединения ряда полиолов обладают низкой токсичностью, эффективно связывают воду, имеют низкую эвтектическую температуру плавления. Они проявили криозащитные свойства при криоконсервировании клеток крови (Лубяный и др., 1981; Ніколенко, 1991; Бабийчук, 2002; Компаниец и др., 2005; Ніколенко и др., 2008).

Целью данной работы являлось исследование сохранности эритроцитов до и после замораживания в зависимости от состава криозащитных сред на основе оксиэтилированного метилцеллозолява.

Материалы и методы

Эритроциты получали из донорской крови человека, заготовленной на гемоконсерванте «Глюгидир» и хранившейся не более 2-х суток в холодильнике (+3°C). Исследовались криозащитные среды на основе оксиэтилированного метилцеллозолява (ОЭМЦ) – криопротектора экзоцеллюлярного механизма действия, полученного путем модификации метилцеллозолява (метилового эфира этиленгликоля) включением в его молекулу этоксигрупп ($\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), $n=33-35$, где n – степень полимеризации. Химическая формула: $\text{CH}_3-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{33-35}\text{H}$. Его очистка и идентификация проводилась в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины в отделе криопротекторов. В качестве криозащитных сред использовали: 20% и 30% ОЭМЦ, приготовленный на 50 мМ и 150 мМ растворах NaCl (чда), 20% ОЭМЦ – на 100 мМ NaCl с добавлением 3% сахарозы (чда), 20% ОЭМЦ – на 50 мМ NaCl с 5% глюкозой (чда), 20% ОЭМЦ – на 50 мМ NaCl с 5% маннитом (чда). Растворы добавляли к эритроцитам в соотношении 1:1 по объему со скоростью 1 мл/мин при температуре 20–22°C. Продолжительность экспозиции составляла 45 минут. Затем взвесь эритроцитов с криозащитными средами переводили в пластиковые контейнеры вместимостью 2 мл и замораживали путем погружения в жидкий азот. Замороженные образцы эритроцитов отогревали на водяной бане при температуре 40–42°C в течение 1 мин. Гематокрит, отражающий степень дегидратации эритроцитомассы до и после экспозиции их в криозащитных средах, определяли в капиллярах с использованием микроцентрифуги МГЦ-8. Содержание внутриклеточного калия измеряли на пламенном фотометре ПАЖ-1 в эритроцитах (с пересчетом на 100% гематокрит) до замораживания после экспозиции клеток в криозащитных средах относительно контроля – эритроцитов, инкубированных в физиологическом растворе, а также после замораживания-отогрева относительно значений, полученных до замораживания после экспозиции клеток со средами. Показатели гемолиза (процент разрушенных клеток до и после криоконсервирования) и осмотической хрупкости (процент разрушенных клеток после их помещения в 0,9% и 0,6% растворы NaCl)

определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 540 нм и рассчитывали относительно 100% гемолиза. Ионную силу (табл.) рассчитывали по формуле Льюиса:

$$I = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2, \text{ где } c_i - \text{концентрация отдельных ионов (моль/л), } z_i - \text{заряд ионов.}$$

Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась с использованием пакета прикладных программ "Excel" и "Statgraphics 5.0. Plus". Для оценки достоверности различий исследуемых показателей применялся непараметрический критерий "U" Вилкоксона-Манна-Уитни для непарных выборок.

Результаты и обсуждение

Исследуемые среды на основе непроникающего криопротектора ОЭМЦ на этапе экспозиции вызвали разную степень дегидратации клеток, которая зависела от состава криозащитной среды: содержания соли (NaCl), углеводов, концентрации криопротектора.

После экспозиции эритроцитов в криозащитных средах на основе 20% и 30%-х концентраций ОЭМЦ на фоне отсутствия гемолизированных клеток показатель гематокрита снизился в среднем на 13–25 % относительно значений для эритроцитов, инкубированных в физиологическом растворе (рис. 1). Наиболее выраженное снижение гематокрита наблюдалось в присутствии 20% и 30%-х концентраций ОЭМЦ, приготовленных на 150 мМ растворе NaCl, соответственно на 22% и 25% (рис. 1).

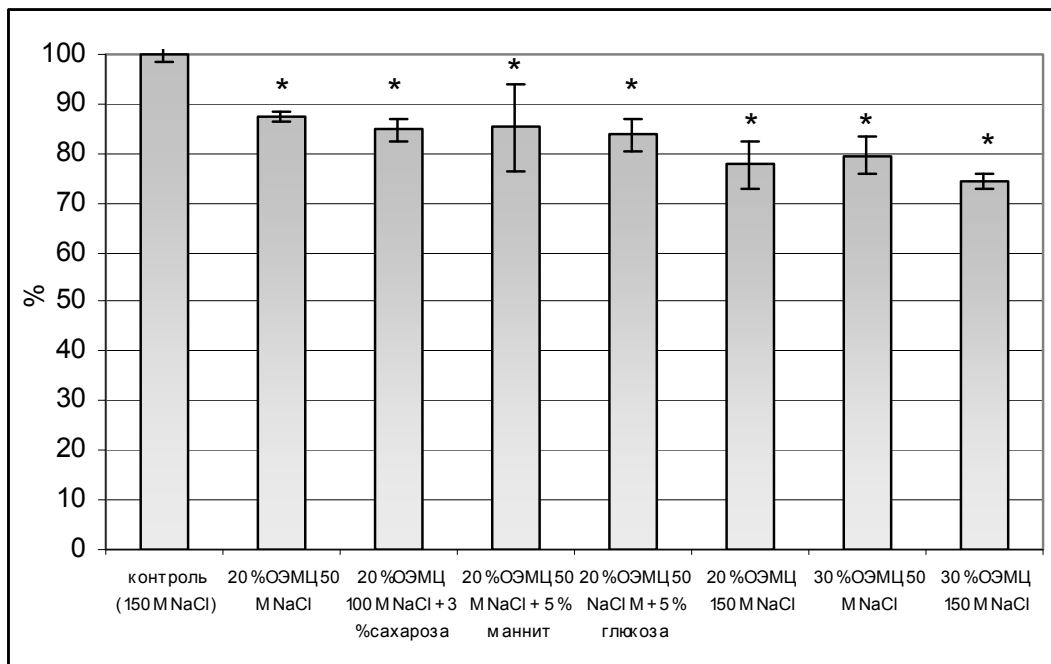


Рис. 1. Показатели гематокрита после экспозиции в криозащитных средах разного состава

*Примечание: достоверность различий относительно контроля: * – p < 0,05.*

Повышение в криозащитной среде концентрации криопротектора с 20% до 30% в присутствии 150 мМ NaCl привело к снижению криоустойчивости эритроцитов (табл.). Количество разрушенных клеток после помещения их в изотонический раствор (0,9% NaCl) увеличилось с 25±1 % до 47±3 %; а при помещении в гипотоническую среду (0,6% NaCl) с 36±1,5 % до 57±4 %. Содержание калия до замораживания в эритроцитах после экспозиции их в растворах с 20% и 30% ОЭМЦ, приготовленных на 150 мМ, составляло 117,04±10,73 ммоль/л (p=0,05) и 106,09±1,6 ммоль/л (p<0,04). После замораживания–отогрева наблюдалось достоверное уменьшение содержания калия в клетках, наиболее выраженное в присутствии 30% ОЭМЦ, которое составляло соответственно 74,75±2,76

ммоль/л и 48,36±7,95 ммоль/л. В результате сохранность внутриклеточного калия в эритроцитах после размораживания в среднем соответствовала 64% и 45% относительно его значений до замораживания (рис. 2). Таким образом, на основании полученных данных, сохранность эритроцитов после замораживания в криозащитной среде с 30% ОЭМЦ в присутствии 150 мМ NaCl была достоверно ниже по сравнению с другими средами; на фоне выраженного снижения гематокрита отмечались высокие показатели осмотической хрупкости и низкие показатели содержания внутриклеточного калия.

Установлена зависимость сохранности эритроцитов от содержания соли в криозащитных средах с 20% и 30% ОЭМЦ. Снижение содержания NaCl с 150 мМ до 50 мМ привело к уменьшению тоничности и ионной силы этих сред, что способствовало улучшению сохранности криоконсервированных эритроцитов. Так, снижение концентрации NaCl с 150 мМ до 50 мМ в криозащитной среде на основе 20% ОЭМЦ привело к менее выраженному снижению показателя гематокрита – на 13% и 22% соответственно. После замораживания-отогрева содержание калия составляло 74,75±2,76 ммоль/л и 67,52±2,82 ммоль/л, что соответствовало в среднем 64% и 70% сохранности внутриклеточного калия относительно значений калия до замораживания (рис. 2). Снижение концентрации NaCl с 150 мМ до 50 мМ в криозащитной среде на основе 20%-й концентрации ОЭМЦ практически не отразилось на показателях осмотической хрупкости эритроцитов в 0,9% растворе NaCl, значение которых составляло 25±1 и 24±2 соответственно, и приводило к уменьшению осмотической хрупкости эритроцитов в 0,6% растворе NaCl с 36±1,5 до 29±3. Уровень гемолиза был выше в присутствии 150 мМ NaCl (табл.).

Таблица.

Влияние состава криозащитных сред на показатели сохранности эритроцитов

Состав среды	Ионная сила	Осмотическая хрупкость в 0,9% NaCl, %	Осмотическая хрупкость в 0,6% NaCl, %	Гемолиз, %
20% ОЭМЦ 50 мМ NaCl	0,05	24±2	29±3	3,4±0,2
20%ОЭМЦ 100 мМ NaCl + 3% сахараза	0,103	23±2	25±3	4,2±0,5
20% ОЭМЦ 50 мМ NaCl + 5% манит	0,05	21±2	22±2	2,6±0,07
20% ОЭМЦ 50 мМ NaCl + 5% глюкоза	0,05	19±1	24±2	3,6±0,1
20% ОЭМЦ 150 мМ NaCl	0,150	25±1	36±1	6,3±0,4
30% ОЭМЦ 50 мМ NaCl	0,05	40±2	46±4	1±0,02
30% ОЭМЦ 150 мМ NaCl	0,150	47±3	57±4	1,6±0,03

Снижение концентрации NaCl с 150 мМ до 50 мМ в криозащитной среде на основе 30% ОЭМЦ привело к достоверному уменьшению содержания калия в эритроцитах до замораживания после экспозиции со средами с 106,22±1,6 ммоль/л ($p < 0,04$) до 99,19±0,92 ммоль/л ($p = 0,04$) (рис. 2). После замораживания-отогрева содержание калия в образцах эритроцитов было соответственно 48,36±7,95 ммоль/л и 56,46±4,02 ммоль/л, что в среднем составляло 45% и 53% относительно значений калия в эритроцитах до замораживания (рис. 2). При этом показатели гематокрита снижались на 25% и 20%. То есть снижение концентрации соли в этих растворах ведет к уменьшению дегидратации клеток и, как следствие, к повышению их криоустойчивости.

Следует отметить, что после замораживания эритроцитов с 30%-ми растворами ОЭМЦ, независимо от концентрации соли, на фоне низкого гемолиза (1–1,5 %) наблюдалось увеличение количества разрушенных клеток после их помещения как в изотонический (0,9%), так и в гипотонический (0,6%) растворы хлористого натрия. Этот эффект наиболее выражен в присутствии 30% ОЭМЦ, приготовленном на 150 мМ NaCl (табл.). Все это может свидетельствовать о наличии латентных повреждений мембраны, которые проявляются при помещении размороженных клеток в изотонический и гипотонический растворы NaCl, и, естественно, чем больше тоничность криозащитной среды, чем больше ионная сила раствора, тем существеннее осмотический дисбаланс, в который попадает клетка при переносе ее из гипертонической среды в гипотоническую.

Таким образом, по результатам исследуемых показателей, характеризующих сохранность криоконсервированных эритроцитов, 20% раствор ОЭМЦ проявил более выраженное криозащитное действие по сравнению с 30% раствором ОЭМЦ. Снижение содержания NaCl с 150 мМ до 50 мМ в криозащитных средах на основе как 20%, так и 30% ОЭМЦ явилось благоприятным фактором для повышения сохранности эритроцитов после замораживания–отогрева.

Изучена устойчивость эритроцитов к замораживанию в криозащитных средах на основе 20%-й концентрации ОЭМЦ в зависимости от соотношения концентраций электролит/неэлектролит. Снижение концентрации соли NaCl в средах проводилось путем замещения электролита (NaCl) неэлектролитами в определенных соотношениях. В качестве неэлектролитов использовали глюкозу, маннит и сахарозу. Было установлено, что снижение концентрации NaCl при его замещении на углеводы способствовало повышению эффективности разработанных композиционных сред на основе 20% ОЭМЦ (табл.). Наблюдалось менее выраженное снижение гематокрита (в среднем на 15–16%), а, следовательно, и дегидратация клеток после экспозиции эритроцитов с криозащитными средами, содержащими сахарозу, маннит и глюкозу (рис. 1). Содержание калия в образцах эритроцитов после экспозиции с данными криозащитными средами составляло $108,35 \pm 7,14$ ммоль/л ($p=0,05$), $105,63 \pm 12,77$ ммоль/л и $99,73 \pm 6,23$ ммоль/л соответственно (рис. 2). После замораживания–оттаивания эритроцитов содержание калия в образцах эритроцитов составляло $78,83 \pm 5,94$ ммоль/л, $86,32 \pm 9,51$ ммоль/л, $83,45 \pm 6,13$ ммоль/л, что соответствовало 73%, 82%, 84% сохранности внутриклеточного калия в размороженных образцах эритроцитов (рис. 2). Значения осмотической хрупкости были достоверно ниже по сравнению с другими средами, процент гемолизированных клеток находился в диапазоне $2,5 \pm 4$ % (табл.). Следует отметить, что изменение состава криозащитной среды, направленное на снижение ионной силы путем замены NaCl углеводами, обеспечивает как «щадящую» дегидратацию, так и стабилизацию клеточной мембраны, что способствует повышению сохранности криоконсервированных эритроцитов. Полученные нами данные согласуются с результатами исследователей, которые в своих работах показали, что углеводы снижают осмотическую нагрузку на клетки, оказывают мембраностабилизирующее действие (Grove et al., 1997; Satpathy et al., 2004). Таким образом, при разработке многокомпонентных криозащитных сред на основе непроникающего криопротектора необходимо учитывать соотношение электролитно-неэлектролитного баланса, определяющего тоничность и ионную силу среды.

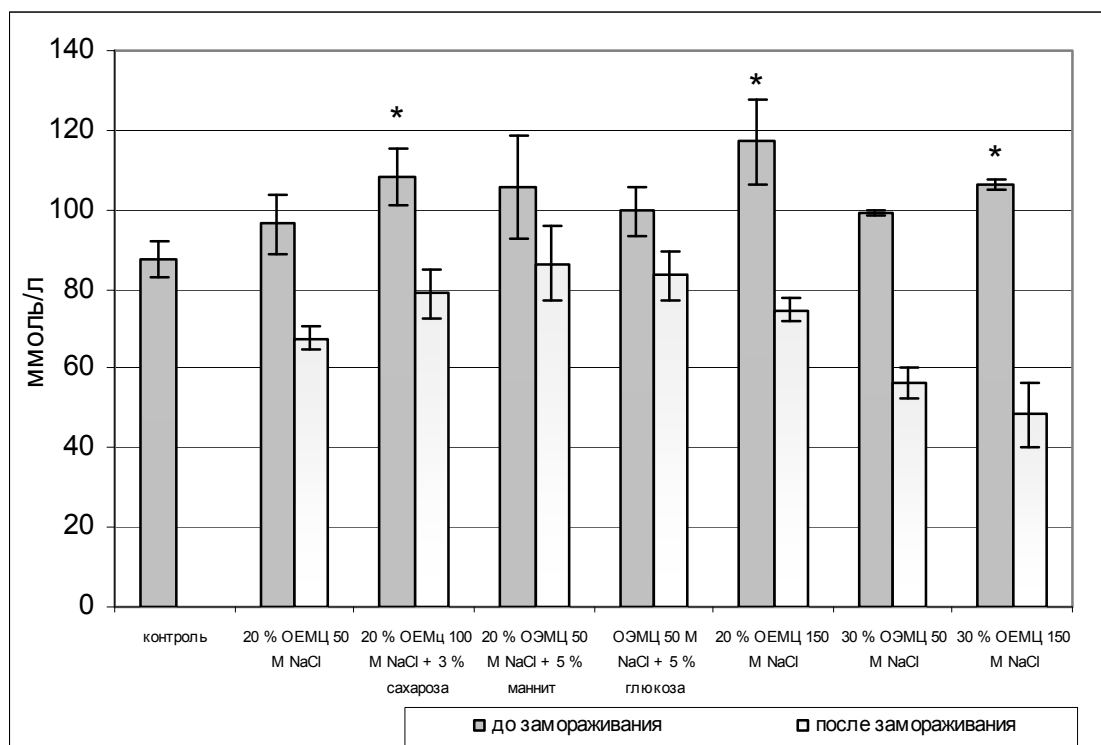


Рис. 2. Содержание внутриклеточного калия в эритроцитах в зависимости от состава криозащитной среды

Примечание: достоверность различий относительно контроля: * – $p < 0,05$.

Виявлена отрицательная корреляция между показателями гематокрита на этапе экспозиции с криозащитными средами и осмотической хрупкостью эритроцитов после замораживания ($k=-0,83$; $p=0,02$ в 0,9% NaCl и $k=-0,88$; $p<0,01$ в 0,6% NaCl). Установлена положительная корреляция между показателями гематокрита и содержанием внутриклеточного калия ($k=0,82$; $p<0,03$). То есть чем ниже показатели гематокрита (более выраженная дегидратация клеток) на этапе экспозиции эритроцитов с исследуемыми криозащитными средами, тем выше показатели осмотической хрупкости и ниже показатели содержания внутриклеточного калия вследствие его большей потери. Снижение содержания внутриклеточного калия после замораживания-оттаивания эритроцитов сопровождалось большей осмотической хрупкостью: $k=-0,94$; $p<0,002$ (в 0,9% NaCl) и $k=-0,97$; $p<0,003$ (в 0,6% NaCl), что, очевидно, связано с наличием латентных повреждений в клеточных мембранах, которые можно выявить при помещении эритроцитов в изотоническую или гипотоническую среды.

Выводы

1. Сохранность эритроцитов человека до и после замораживания–отогрева зависит от состава криозащитной среды: концентрации криопротектора ОЭМЦ, содержания соли (NaCl), соотношения содержания соли и углеводов, определяющих тоничность среды и ионную силу. Снижение концентрации ОЭМЦ с 30% до 20%, а также снижение содержания соли NaCl с 150 мМ до 50 мМ, в т.ч. путем замены ее на сахарозу, маннит, глюкозу, способствовало повышению сохранности эритроцитов.

2. Виявлена корреляция между показателями гематокрита, содержанием внутриклеточного калия и осмотической хрупкостью эритроцитов при использовании криозащитных сред разного состава. Дегидратация клеток на этапе экспозиции является одним из значимых факторов, влияющих на сохранность криоконсервированных эритроцитов.

3. Показана эффективность использования для замораживания эритроцитов человека разработанных криозащитных сред на основе 20% ОЭМЦ в присутствии 50 мМ NaCl с добавлением 5% глюкозы или 5% маннита, а также 20% ОЭМЦ в присутствии 100 мМ NaCl с добавлением 3% сахарозы.

Список литературы

- Бабийчук Л.А. Механизмы температурно-осмотической стабильности эритроцитов при охлаждении и замораживании в присутствии непроницающего криопротектора. Дисс. докт. биол. наук. – Харьков, 2002. – 300с. /Babiychuk L.A. Mekhanizmy temperaturno-osmoticheskoy stabil'nosti eritrotsitov pri okhlazhdenii i zamorazhivanii v prisutstvii nepronikayushchego krioprotektora. Diss. ... dokt. biol. nauk. – Khar'kov – 2002. – 300s./
- Белоус А.М., Грищенко В.И. Кробиологія. – Киев: Наукова думка, 1994. – 430с. /Belous A.M., Grishchenko V.I. Kriobiologiya. – Kiev: Naukova dumka, 1994. – 430s./
- Животова Е.Н., Кулешова Л.Г., Зинченко А.В., Чеканова В.В. Исследование физических состояний бинарных систем вода-оксиэтилированный глицерин со степенью полимеризации $n=5$ и $n=25$ при температурах ниже 273 К методом криомикроскопии // Доповіді Національної академії наук України. – 2007. – №4. – С. 78–84. /Zivotova Ye.N., Kuleshova L.G., Zinchenko A.V., Chekanova V.V. Issledovaniye fizicheskikh sostoyaniy binarnykh sistem voda-oksietilirovannyi glitserin so stepen'yu polimerizatsii $n=5$ i $n=25$ pri temperaturakh nizhe 273 K metodom kriomikroskopii // Dopovidi Natsional'noi akademii nauk Ukrainy. – 2007. – №4. – S. 78–84./
- Компаниец А.М., Ніколенко А.В., Чеканова В.В., Троц Ю.П. Криоконсервирование эритроцитов под защитой олигомера оксиэтилированного глицерина ($n=25$) // Проблемы кробиологии. – 2005. – Т.15, №3. – С. 561–565. /Kompaniyets A.M., Nikolenko A.V., Chekanova V.V., Trots Yu.P. Kriokonservirovaniye eritrotsitov pod zashchitoy oligomera oksietilirovannogo glitserina ($n=25$) // Problemy kriobiologii. – 2005. – T. 15, №3. – S. 561–565./
- Лубяный В.Г., Бредихина Л.П., Шраго М.И. Криопротекторная активность олигомеров ОЭГ в низкотемпературном консервировании эритроцитов // Кробиологія і кривої медицина. – 1981. – Вып.8. – С. 34–40. /Lubyanyy V.G., Bredikhina L.P., Shrago M.I. Krioprotekornaya aktivnost' oligomerov OEG v nizkotemperaturnom konservirovanii eritrotsitov // Kriobiologiya i kriomeditsina. – 1981. – Vyp.8. – S. 34–40./
- Ніколенко А.В. Криопротекторные свойства полиолов и их производных при замораживании тромбоцитов. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1991. – 20с. /Nikolenko A.V. Krioprotekornyye svoystva polioloiv i ikh proizvodnykh pri zamorazhivanii trombotsitov. Avtoref. diss. ... kand. biol. nauk. – Khar'kov, 1991. – 20s./
- Ніколенко А.В., Овсянников С.Е., Есипова Ю.С., Компаниец А.М. Влияние многокомпонентных криозащитных сред на сохранность эритроцитов человека // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем. Восьмой съезд белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков. – Минск, 2008. – С. 119–121. /Nikolenko A.V., Ovsyannikov S.Ye., Yesipova Yu.S., Kompaniyets A.M. Vliyaniye mnogokomponentnykh kriozashchitnykh sred na sokhrannost' eritrotsitov cheloveka // Molekulyarnyye, membrannyye i kletochnyye osnovy funktsionirovaniya biosistem. Vos'moy s'yezd belorusskogo obshchestvennogo ob'yedineniya fotobiologov i biofizikov. – Minsk, 2008. – S. 119–121./

Поздняков В.В. Влияние состава и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к осмотическому и температурному шоку. Дисс. ... канд. биол. наук. - Харьков, 1988. – 121с. /Pozdnyakov V.V. Vliyaniye sostava i osmolyarnosti sredy na ustoychivost' eritrotsitov k osmoticheskomu i temperaturnomu shoku. Diss. ... kand. biol. nauk. – Khar'kov, 1988. – 121s./

Пушкар Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М. Криопротекторы. – Київ: Наукова думка, 1978. – 204с. /Pushkar N.S., Shrago M.I., Belous A.M. Krioprotektory. – Kyiv: Naukova dumka, 1978. – 204s./

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, Issue 1. – P. 20–30.

Nandhini T.A., Anuradha C.V. Inhibition of lipid peroxidation, protein glycation and elevation of membrane ion pump activity by taurine in PBS exposed to high glucose // *Clin. Chim. Acta*. – 2003. – Vol.336. – P. 129–135.

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, Issue 3. – P. 258–267.

Satpathy G.R., Török Z., Bali R. et al. Loading red blood cells with trehalose: a step towards biostabilization // *Cryobiology*. – 2004. – Vol.49, Issue 2. – P. 123–136.

Представлено: В.В.Давидов / Presented by: V.V.Davydov

Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky

Подано до редакції / Received: 10.11.2010.