

В.В. Рамазанов, Е.Л. Воловельська, В.О. Коптелов, В.А. Бондаренко

Властивості еритроцитів з невисоким ступенем збереження після заморожування в середовищі з непроникними та проникними кріопротекторами

Ін-т проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків; E-mail: ramazanov.viktor@mail.ru

Досліджували осмотичні, антиоксидантні та морфологічні характеристики еритроцитів, заморожених у рідкому азоті (-196°C) у середовищі, що містить цукрозу, декстран і диметилсульфоксид. При заморожуванні у середовищі, з цукрозою або цукрозою та декстраном порушуються осмотичні та морфологічні властивості клітин, що залишилися після відмивання кріоконсерванта, але не виявлено вірогідної зміни концентрації малонового діальдегіду й активності глутатіонзалежних ферментів (глутатіонредуктази і глутатіонпероксидази). Додавання диметилсульфоксиду знижує ступінь пошкодження еритроцитів при заморожуванні та зберігає осмотичні, антиоксидантні та морфологічні характеристики клітин, що залишилися, незалежно від ступеня їх збереження після відмивання кріоконсерванта. Показано, що для збереження властивостей еритроцитів при заморожуванні кріоконсервант повинен включати комбінацію непроникного і проникного кріопротекторів. Ключові слова: еритроцити, осмотичні, антиоксидантні та морфологічні властивості, заморожування, комбінований кріоконсервант.

ВСТУП

Заморожування еритроцитів у фізіологічному розчині NaCl значно пошкоджує та трансформує клітини в мієліноподібні структури, від яких відділяються везикули. Включення у середовище заморожування декстрану запобігає везикуляції та значному гемолізу еритроцитів. Клітини, що при цьому залишилися, морфологічно представлені в основному дискоцитами (нормоцитами) з невисоким вмістом ехіноцитів [1]. Такі морфологічні показники характерні для клітин, що не відмивалися від декстрану після заморожування. Еритроцити, які заморожували у середовищі з декстраном (30 %) і відмивали від кріоконсерванта фізіологічним розчином NaCl (0,9 %), морфологічно представлені сфероцитами і є осмотично крихкими [1]. Кріоконсервування еритроцитів з полімерними кріопротекторами може виключати процедуру їх відмивання, але трансфузія клітин з полімерами призводить

до лейкоцитозу, підвищення концентрації гемоглобіну та білірубину у плазмі, а також затримується виведення цих кріопротекторів з організму [2]. Для усунення згаданих проблем слід відмивати кріопротектори перед трансфузією [3], але це порушить осмотичну стійкість еритроцитів [1, 2].

Раніше нами було показано, що використання комбінованого середовища з непроникними та проникними кріопротекторами дає змогу відмивати заморожені еритроцити фізіологічним розчином NaCl з отриманням високого ступеня збереження й осмотичної стійкості відмитих клітин з їх нормальними морфологічними й антиоксидантними характеристиками [4]. Відомо, що в циклі заморожування–відігрівання на пошкодження клітин впливає гіпертонічний (при заморожуванні) і післягіпертонічний стрес (при відігріванні) [5–7]. При заморожуванні еритроцитів у цукрозному середовищі

© В.В. Рамазанов, Е.Л. Воловельська, В.О. Коптелов, В.А. Бондаренко

(0,3 % NaCl та 6,85 % цукрози) на гемоліз значно діє післягіпертонічний стрес. Додавання в указане середовище 5 % диметилсульфоксиду (ДМСО) в циклі заморожування–відігрівання знижувало гемоліз еритроцитів і послабляло дію післягіпертонічного стресу до 35 % [8]. Відмивання відігрітих клітин може призвести до гемолізу залишку пошкоджених еритроцитів. У результаті отримуємо фракцію клітин найбільш стійких до ушкоджувальних чинників заморожування–відігрівання, які зберігатимуть свої властивості після відмивання кріоконсерванта.

Транспорт сульфату в еритроцити у сульфатному середовищі пов'язаний з переміщенням H^+ [9]. Можна припустити, що у разі пошкодження мембран аніони SO_4^{2-} і, відповідно, іони водню проникатимуть в еритроцити додатковим неспецифічним шляхом. При цьому обчислювані швидкості транспорту іонів можуть перевищувати відповідні показники для інтактних клітин. Отже, дослідження транспорту H^+ і SO_4^{2-} допоможе оцінити бар'єрну функцію мембран еритроцитів при заморожуванні. За таких умов у них виникають пошкодження, які при відмиванні кріоконсерванта утворюють гемолітичні пори, проникні для гемоглобіну. Проте в клітинах, що залишилися, вказані пошкодження можуть утворювати пори меншого розміру, непроникні для гемоглобіну (молекулярна маса 64500), але проникні для таких молекул менших розмірів, як глутатіон (молекулярна маса 307). Тому ці клітини можуть втрачати бар'єрну функцію мембран для глутатіону.

Мета роботи – визначити осмотичні, антиоксидантні та морфологічні характеристики заморожених еритроцитів, що мають невисокий ступінь збереження після відмивання кріоконсерванта.

МЕТОДИКА

У дослідах використовували NaCl (х.ч.), цукрозу (х.ч.), ДМСО («Sigma», США), декстран з молекулярною масою 35000 («Serva»,

Німеччина). Середовища заморожування містили (у відсотках): NaCl – 0,3; цукрози – 6,85; ДМСО – 5; декстрану – 10–20.

Еритроцити отримували з крові 2-ї групи донорів чоловічої статі після чотирикратного відмивання їх ізотонічним розчином NaCl. Металеві контейнери об'ємом 1 мл зі зразками еритроцитів у середовищах заморожування з 40%-м гематокритом інкубували 30 хв при 25 °С, потім занурювали в рідкий азот (–196 °С) на 30 хв. Зразки еритроцитів розморожували на водяній бані при 40 °С протягом 2 хв. Потім до 1 мл клітинної суспензії при перемішуванні повільно додавали 9 мл теплового (37 °С) ізотонічного розчину NaCl (швидкість додавання – не більше 0,3 мл/с). Суспензію центрифугували при 3000 хв^{–1} протягом 5 хв і видаляли надосадову рідину. Процедура розведення та центрифугування повторювали ще один раз. Після цього еритроцити тричі відмивали теплим (37 °С) ізотонічним розчином NaCl, при цьому швидкість розведення осаду еритроцитів не враховували.

Осмотичний гемоліз еритроцитів досліджували у середовищі, що містить 10 ммоль/л тріс-буфера (рН 7,4) і NaCl з різною концентрацією (0,09–0,9 %). Клітини у середовищі об'ємом 1 мл з 0,6%-м гематокритом інкубували 15 хв при 25 °С, далі центрифугували при 3000 хв^{–1} протягом 3 хв з подальшим вимірюванням ступеня гемолізу в надосадовій рідині.

Гемоліз еритроцитів обчислювали після спектрофотометричного визначення кількості гемоглобіну, вимірюючи поглинання у супернатанті зразків при довжині хвилі 543 нм:

$$\text{ступінь гемолізу (у відсотках)} = \frac{[A1/A2] \cdot 100 \%}{[A1/A2]}$$

де A1 – поглинання супернатанту експериментального зразка; A2 – поглинання при повному гемолізі контрольного зразка.

Транспорт іонів водню в еритроцитах у сульфатному середовищі без буфера досліджували в термостатованій (37 °С) посудині з рН-електродом, постійно перемішуючи клітинну суспензію [9]. При внесенні еритро-

цитів до ізотонічного розчину Na_2SO_4 , що не містить буферних компонентів, відбувається двофазна зміна рН зовнішнього середовища – закиснення з подальшим залуженням. Така зміна пов'язана з обміном внутрішньоклітинного аніона Cl^- на позаклітинний SO_4^{2-} . При цьому вихід H^+ з клітини визначається функціонуванням циклу Якобса–Стюарта, тоді як вхід пов'язаний безпосередньо з транспортом SO_4^{2-} в клітину [9].

Для оцінки транспорту SO_4^{2-} використовували величину потоку іонів H^+ , яку обчислювали за формулою:

$$J = k \cdot (V/A) \cdot \Delta\text{H}, \quad (\text{моль} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}),$$

де ΔH – зміна концентрації H^+ у зовнішньому середовищі по ходу обміну Cl^- на SO_4^{2-} [10]; k – константа швидкості входу H^+ (с^{-1}), яку обраховували за методом Рамазанова та співавт. [10]; V/A – відношення об'єму внутрішньоклітинної води до площі поверхні мембрани. У ізотонічних умовах для еритроцитів $V/A = 6,3 \cdot 10^{-5} \text{ см}$ [11].

Вміст глутатіону в еритроцитах визначали спектрофотометрично з використанням дитіобіснітробензойної кислоти при довжині хвилі 412 нм [12], малоновий діальдегід (МДА) – колориметрично при довжині хвилі 535 нм, використовуючи тіобарбітурову кислоту [13]. Активність глутатіонпероксидази оцінювали за методом Разиграєва та співавт. [14] з використанням дитіобіснітробензойної кислоти, активність глутатіонредуктази – із застосуванням методу Юсупова [15].

Морфологію еритроцитів до та після заморожування вивчали за допомогою світлового мікроскопа. У суспензію еритроцитів з 2%-м гематокритом вносили альбумін у концентрації 1 %, перемішували та тестували зміну морфології клітин.

Статистичні розрахунки проводили на основі результатів, отриманих на еритроцитах від семи донорів. Результати представлені як середнє значення \pm стандартна помилка. Для визначення статистичної вірогідності результатів використовували непараметричний метод Манна–Уїтні при $P < 0,05$ [16].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Заморожування еритроцитів у цукрозному середовищі (0,3 % NaCl + 6,85 % цукрози) значно пошкоджує клітини (84,5 %), при відмиванні кріоконсерванта зменшується концентрація глутатіону у клітинах, що залишилися. Крім того, підвищується потік іонів H^+ (відповідно, і аніонів SO_4^{2-}) у негемолізованих еритроцитах в сульфатному середовищі порівняно з інтактними клітинами. Включення у середовище заморожування декстрану (10–20 %) знижує ступінь пошкодження еритроцитів, проте відмивання кріоконсерванта не відмінє зменшення концентрації глутатіону у негемолізованих клітинах і збільшення показника потоку H^+ у залишку клітин порівняно з інтактними еритроцитами (табл. 1). Результати указують на те, що зменшення концентрації глутатіону у клітинах пов'язане з втратою бар'єрної функції мембран при відмиванні кріоконсерванта.

Додавання 5 % ДМСО у середовище заморожування з цукрозою або сумішшю цукрози та декстрану знижує пошкодження еритроцитів, при цьому відмивання кріоконсерванта не викликає вірогідної зміни концентрації глутатіону в негемолізованих клітинах, потік іонів водню у залишку клітин вірогідно не відрізняється від такого для інтактних еритроцитів (див. табл. 1).

На рис. 1 показано зниження осмотичної стійкості еритроцитів, заморожених у середовищі з цукрозою; при поєднанні цукрози та ДМСО крива осмотичного гемолізу еритроцитів неістотно відрізняється від такої для інтактних клітин, що свідчить про збереження осмотичної стійкості еритроцитів, які заморожували у комбінованому середовищі (див. рис. 1,а). Після заморожування еритроцитів у середовищі з цукрозою та декстраном визначається двояка зміна їх осмотичної стійкості. У середовищі при концентрації NaCl 0,45–0,9 % знижується осмотична стійкість еритроцитів, тоді як в інтервалі концентрації солі 0,09–0,4 % вона, навпаки, підвищується

Таблиця. 1. Осмотичні показники еритроцитів, відмитих після заморожування в різних захисних середовищах

Зразки клітин	Гемоліз, %	Глутатіон, мкмоль/г гемогло- біну	Потік іонів водню у сульфат- ному середовищі ($J_{in} \cdot 10^6$), моль \cdot см $^{-2} \cdot$ с $^{-1}$
Інтактні	0,0 \pm 0,0	10,5 \pm 1,6	0,91 \pm 0,13
Заморожені в середовищі			
цукроза	84,5 \pm 3,0	¹ 9,8 \pm 1,4 ² 4,2 \pm 0,7**	1,55 \pm 0,22*
цукроза та декстрин (10 %)	65,0 \pm 3,5	¹ 9,9 \pm 1,6 ² 4,5 \pm 0,6**	1,53 \pm 0,23*
цукроза та декстран (20 %)	37,0 \pm 3,5	¹ 9,7 \pm 1,5 ² 4,3 \pm 0,7**	1,56 \pm 0,24*
цукроза та диметилсульфоксид	63,0 \pm 2,5	¹ 9,5 \pm 1,7 ² 8,2 \pm 1,3	1,15 \pm 0,17
цукроза, декстран (20 %) та диметилсульфоксид	16,0 \pm 4,0	¹ 9,6 \pm 1,7 ² 8,5 \pm 1,5	1,14 \pm 0,17

¹ – до відмивання, ² – після відмивання. *P<0,05 порівняно з інтактними еритроцитами ; **P<0,05 порівняно з невідмитими еритроцитами.

порівняно з інтактними клітинами (див. рис. 1,б). При поєднанні цукрози, декстрану та ДМСО, крива осмотичного гемолізу заморожених еритроцитів практично не відрізняється від інтактних клітин (див. рис. 1,в).

Раніше припускали, що підвищення осмотичної стійкості заморожених еритроцитів в інтервалі концентрації NaCl 0,09–0,4 % пов'язане зі зростанням градієнта концентрації декстрану на мембранах клітин при охолодженні. При цьому включення у середовище заморожування ДМСО і надходження його в клітини послаблює ефект, пов'язаний з концентруванням декстрану [17].

Після заморожування еритроцитів і відмивання їх від кріоконсерванта (незалежно від складу) вміст МДА не підвищується і активність глутатіонзалежних ферментів не змінюється (табл. 2).

На рис. 2 показано мікрофотографії еритроцитів, відмитих ізотонічним розчином NaCl. Інтактні клітини представлені стома-тоцитами (70–80 %) і ехіноцитами (20–30 %) – фото 1,а за наявності альбуміну еритроцити перетворюються у дискоцити (нормоцити) – фото 4. Еритроцити, відмиті після заморожування у середовищі із цукрозою або сумішшю цукрози та декстрану, є сфероцитами (фото

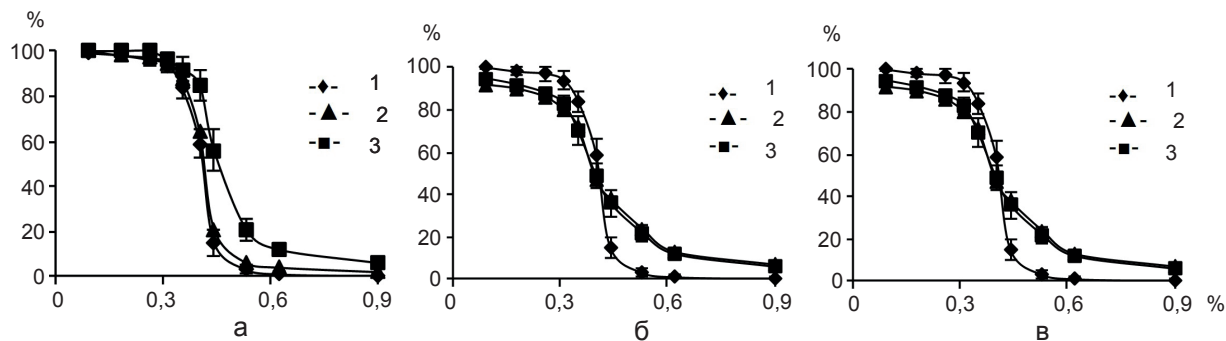


Рис. 1. Залежність гемолізу від концентрації NaCl для еритроцитів, відмитих після заморожування в різних середовищах з цукрозою, на а: 1 – інтактні клітини; 2 – цукроза та диметилсульфоксид (ДМСО); 3 – цукроза, на б: 1 – інтактні клітини; 2 – цукроза та декстран (10 %); 3 – цукроза та декстран (20 %), на в: 1 – інтактні клітини; 2 – цукроза, декстран (20 %) та ДМСО

Таблиця 2. Антиоксидантні показники еритроцитів, відмитих після заморожування в різних захисних середовищах

Зразки клітин	Малоновий діальдегід, мкмоль/г Hb	Глутатіон-пероксидаза, мкмоль/(хв · г Hb)	Глутатіонредуктаза, мкмоль/(хв · г Hb)
Інтактні	0,98±0,13	155,8±22,4	14,6±2,3
Заморожені в середовищі цукроза	1,23±0,19	140,0±21,0	12,5±2,1
цукроза та декстрин (10 %)	1,20±0,17	145,5±24,0	12,6±2,0
цукроза та декстран (20 %)	1,21±0,18	142,8±22,5	12,0±2,0
цукроза та диметилсульфоксид	1,19±0,18	146,5±22,5	12,8±2,2
цукроза, декстран (20 %) та диметилсульфоксид	1,21±0,20	148,5±20,0	13,0±2,1

2,3,7), дія альбуміну змінює форму клітин, і вони стають сфероехіноцитами та ехіноцитами (фото 5,6,10). Після заморожування у середовищах із сумішшю цукрози та ДМСО або цукрози, декстрану та ДМСО, еритроцити представлені ехіноцитами і сфероехіноцитами (фото 8,9), водночас дія альбуміну змінює форму клітин, і вони стають в основному дискоцитами (65–70 %) з домішками стоматоцитів (10–20 %) та ехіноцитів (10–20 %) (фото 11,12).

Результати нашої роботи вказують на те, що порушення осмотичних властивостей заморожених еритроцитів визначається пошкодженнями безпосередньо при заморожуванні–відігріванні. Включення у середовище заморожування ДМСО забезпечує збереження осмотичних і морфологічних властивостей еритроцитів, до того ж, ці показники подібні до зразків еритроцитів як з більшим (63,0 %) так і з меншим (16,0 %) ступенем пошкодження (див. табл. 1, рис. 1, рис. 2). Механізм збереження властивостей еритроцитів при заморожуванні визначається поєднанням у середовищі сахарози і ДМСО, а ступінь збереження – концентрацією декстрану в кріоконсерванті.

Очевидно, залишок клітин після заморожування у середовищі з цукрозою і ДМСО (див. табл. 1) є найбільш стійким до ушкоджувальних чинників заморожування–відігрівання і, ймовірно, являє собою певні вікові фракції еритроцитів.

У зв'язку з цим слід зазначити, що фракції «молодих» і «старих» еритроцитів мають меншу деформованість, ніж клітини середнього віку [18]. При заморожуванні клітинної суспензії і вимерзанні води в каналах між кристалами льоду клітини піддаються механічному зрушувальним діям, що їх деформує та пошкоджує [6]. При розморожуванні і таненні льоду висока концентрація клітин створює умови, які перешкоджають рівномірному розведенню концентрованого розчину водою, і клітини в різних ділянках піддаватимуться гіпертонічній або гіпотонічній дії [7]. Раніше показано, що при заморожуванні–відігріванні еритроцитів поєднання у кріоконсерванті цукрози з ДМСО забезпечує послаблення післягіпертонічного (осмотичного) стресу [8], тому кріопротекторна ефективність комбінованого середовища визначається її властивістю послабляти післягіпертонічну дію на клітини при відігріванні.

Дані літератури дають змогу припустити, що при значному ступені пошкодження (63,0 %, див. табл. 1) частина еритроцитів, що залишилися після заморожування, включає клітини, які до заморожування були найбільш деформовані та стійкі до осмотичної дії, можливо, це еритроцити середньої фізіологічної

зрілості. Проте еритроцити, що збереглися, ймовірно, будуть модифіковані за реологічними характеристиками, оскільки ці клітини морфологічно представлені ехіноцитами та сфероехіноцитами (див. рис. 2, фото 8). Разом з тим у еритроцитах, що залишилися після заморожування в комбінованому середовищі з цукрозою і ДМСО, не виявлено вірогідних змін антиоксидантних показників (див. табл. 1, табл. 2). У зв'язку з цим слід зазначити, що

при «старінні» еритроцитів вміст глутатіону, а також активність ферментів глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази знижується, а концентрація МДА підвищується [19]. Це свідчить, що еритроцити з невисоким ступенем збереження після заморожування у середовищі з цукрозою і ДМСО (див. табл. 1, табл. 2) включають фракцію клітин, яка приблизно однорідна за фізіологічною зрілістю. Водночас не виявлено вірогідних від-

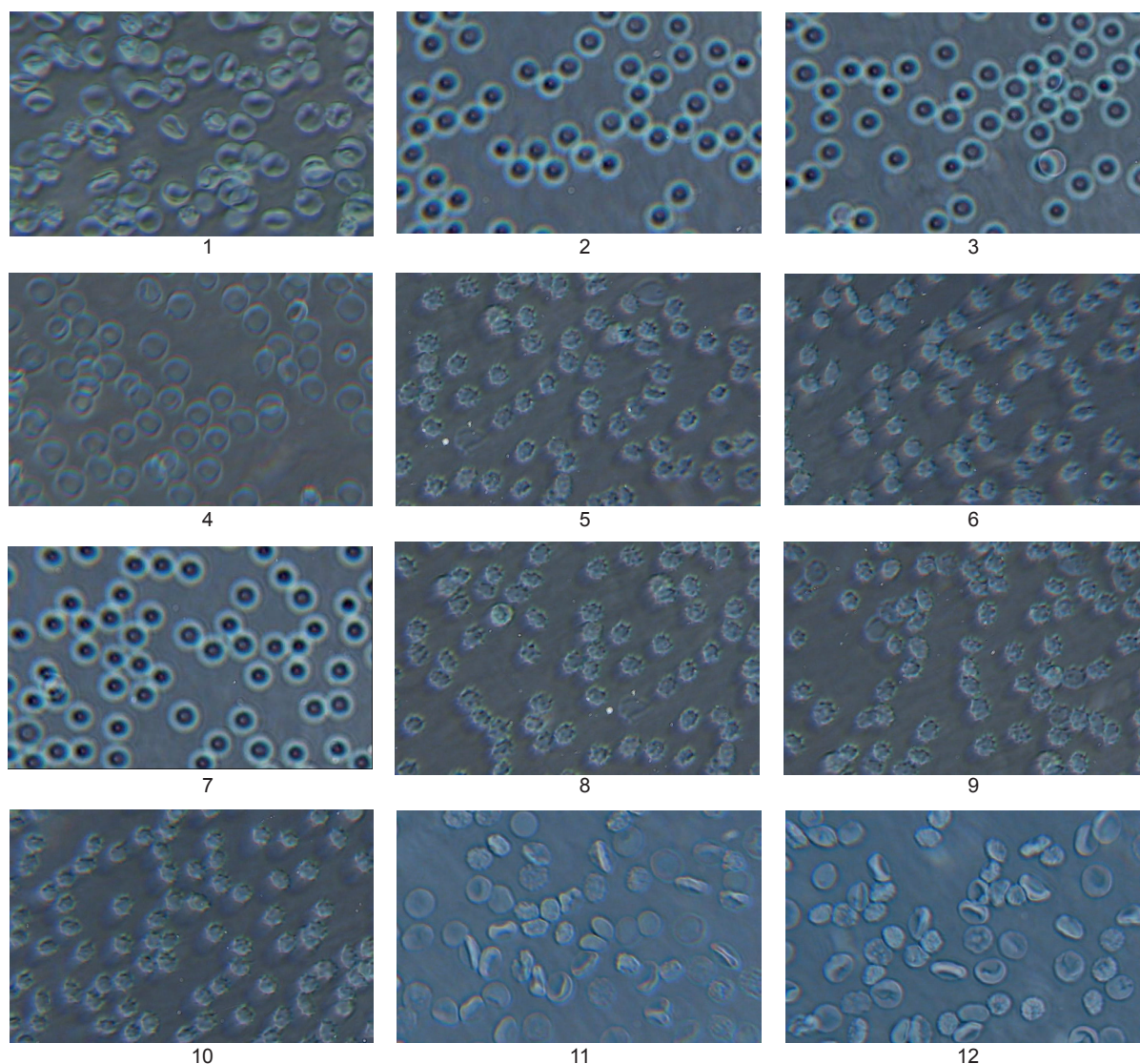


Рис. 2. Морфологія еритроцитів, які заморожували у цукрозному середовищі з декстраном та диметилсульфоксидом (ДМСО): 1,4 – інтактні клітини; 2,5 – цукроза; 3,6 – цукроза та декстран (10 %); 7,10 – цукроза та декстран (20 %); 8,11 – цукроза та ДМСО; 9,12 – цукроза, декстран (20 %) та ДМСО. 1,2,3,7,8,9 – без альбуміну; 4,5,6,10,11,12 – з альбуміном (1 %)

мінностей в антиоксидантних показниках між залишками еритроцитів з різним ступенем збереження (див. табл. 1, табл. 2). Ймовірно, це пов'язано з тим, що при «старінні» еритроцитів людини антиоксидантні показники змінюються несуттєво (приблизно 30 %) [19].

Таким чином, при заморожуванні еритроцитів у середовищі з цукрозою або з сумішшю цукрози та декстрану значно пошкоджуються клітини та змінюються осмотичні і морфологічні властивості частини еритроцитів, що залишилися після відмивання кріоконсерванта. Водночас концентрація МДА й активність глутатіонзалежних ферментів не змінюється. Включення у кріоконсервант ДМСО забезпечує ефективну кріозахисну дію комбінованого складу, яка протидіє ушкоджувальним чинникам при заморожуванні–відігріванні і дає змогу отримати відмиті еритроцити із задовільними осмотичними, антиоксидантними і морфологічними показниками. Разом з тим залишок еритроцитів, при значному пошкодженні клітин, які були заморожені у середовищі з цукрозою та ДМСО, також має задовільні властивості і, можливо, включає популяцію еритроцитів середньої фізіологічної зрілості. Отримані результати вказують на те, що кріоконсервант повинен включати комбінацію непроникного і проникного кріопротекторів для збереження осмотичних і морфологічних властивостей заморожених еритроцитів, незалежно від ступеня їх пошкодження.

ВИСНОВКИ

1. Заморожування еритроцитів у середовищі, що містить цукрозу або суміш цукрози та декстрану, призводить до втрати бар'єрної функції мембран для сульфату і глутатіону в частині клітин, що залишилися. При цьому еритроцити є осмотично нестабільними та морфологічно представлені сфероцитами.

2. Заморожування еритроцитів у середовищі, що містить суміш цукрози і ДМСО або цукрози, декстрану і ДМСО забезпечує

збереження бар'єрної функції мембран для сульфату і глутатіону в частині клітин, що залишилися. При цьому еритроцити представлені ехіноцитами, проте за наявності альбуміну основна їх частина трансформує у дискоцити (нормоцити).

**В.В. Рамазанов, Е.Л. Воловельская,
В.А. Коптелов, В.А. Бондаренко**

СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ С НЕВЫСОКОЙ СТЕПЕНЬЮ СОХРАННОСТИ ПОСЛЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ В СРЕДЕ С НЕПРОНИКАЮЩИМ И ПРОНИКАЮЩИМ КРИОПРОТЕКТОРАМИ

Исследовали осмотические, антиоксидантные и морфологические характеристики эритроцитов, замороженных в жидком азоте (-196°C) в среде, содержащей сахарозу, декстран и диметилсульфоксид. При замораживании в среде, содержащей сахарозу или сахарозу и декстран нарушаются осмотические и морфологические характеристики в оставшейся части клеток после отмывания криоконсерванта. Не выявлено достоверного изменения концентрации малонового диальдегида и показателей активности глутатионзависимых ферментов (глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы). Включение в указанные среды диметилсульфоксида приводит к снижению степени повреждения эритроцитов при замораживании и сохранению осмотических, антиоксидантных и морфологических свойств оставшейся части клеток независимо от степени их сохранности после отмывания криоконсерванта. Полученные результаты указывают на то, что для сохранения свойств эритроцитов при замораживании криоконсервант должен включать комбинацию непроникающего и проникающего криопротекторов.

Ключевые слова: эритроциты, осмотические, антиоксидантные и морфологические свойства, замораживание, комбинированный криоконсервант.

**V.V. Ramazanov, E.L. Volovelskaya, V.A. Koptelov,
V.A. Bondarenko**

PROPERTIES OF ERYTHROCYTES WITH LOW DEGREE OF INTEGRITY AFTER FREEZING WITH NON-PENETRATING AND PENETRATING CRYOPROTECTANTS

Osmotic, antioxidant and morphological characteristics of erythrocytes frozen in liquid nitrogen (-196°C) in the medium containing sucrose, dextran and DMSO were studied. During freezing in the medium containing sucrose and sucrose and dextran there is noted the disorder in osmotic and morphological characteristics of the rest of cells after washing-out from

cryopreservative. We have not revealed a significant change in concentration of malondialdehyde and the indices of activity of glutathione-dependent enzymes (glutathione reductase and glutathione peroxidase). Inclusion of DMSO into the mentioned media results in the decreased degree of erythrocytes damage during freezing and preservation of osmotic, antioxidant and morphological indices of the rest of cells independent of the degree of their integrity after washing-out from cryopreservative. The obtained results indicate that in order to preserve the properties of erythrocytes during freezing the cryopreservative should include the combination of non-penetrating and penetrating cryoprotectants.

Key words: erythrocytes, osmotic, antioxidant and morphological properties, freezing, combined cryopreservative.

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

REFERENCES

1. Pellerin-Mendes C., Million L., Marchand-Arvier M., et al. In vitro study of the protective effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen. *Cryobiology*. 1997; 35(2): 173–86.
2. Sutteck A., Singbartl G., Langer R., et. al. Cryopreservation of erythrocytes using hydroxyethyl starch: in vivo results of an autologous retransfusion model in humans. *Beitr Infusionsther Transfusionsmed*. 1994; 32: 44–7.
3. Wagner C.T., Martowicz M.L., Livesey S.A., Connor J. Biochemical stabilization enhances red blood cell recovery and stability following cryopreservation. *Cryobiology*. 2002; 45(2): 153–66.
4. Ramazanov V.V., Dejneko T.I., Volovelskaya E.L., et al. Properties of erythrocytes frozen in combined medium with polyethylene glycol and dimethylsulfoxide. *Biotechnology*. 2012; 5(2): 106–14 [Ukrainian].
5. Bakhach J. The cryopreservation of composite tissues. Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. *Organogenesis*. 2009; 5(3): 119–26.
6. Mazur P., Cole K.W. Roles of unfrozen fraction, salt concentration, and changes in cell volume in the survival of frozen human erythrocytes. *Cryobiology*. 1989; 26(1): 1–29.
7. Pegg D.E. The effect of cell concentration on the recovery of human erythrocytes after freezing and thawing in the presence of glycerol. *Cryobiology*. 1981; 18(3): 221–8.
8. Ramazanov V.V. Effect of combined media on damage of erythrocytes frozen with different hematocrit values. *Problems of Cryobiology*. 2006; 16 (2): 155–163 [Ukrainian].
9. Romano L., Passow H. Characterization of anion transport system in trout red blood cell. *Am. J. Physiol*. 1984; 246(3): 330–8.
10. Ramazanov V.V., Zabrodskiy R.F., Nayduk Ya.Yu., Bondarenko V.A. H⁺ ion transport system functioning upon erythrocyte membrane modifications under conditions modeling freezing conditions. *Visnyk Problem Biologii i Medytsyny*. 2010; Iss 3: 186–192 [Ukrainian].
11. Wieth J.O., Bjerrum P.J., Borders C.L. Irreversible inactivation of red cell chloride exchange with phenylglyoxal, and arginine-specific reagent. *J Gen. Physiol*. 1982; 79(2): 283–312.
12. Beutler E. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. New York: Grune&Stratton; 1975. 160 p.
13. Vladimirov Yu.A., Archakov A.I. Lipid peroxidation and biological membranes. Moscow: Nauka; 1972. 270 p. [Russian].
14. Razygraev A.V., Arutunyan A.V. Determination of glutathione peroxidase activity in human blood serum using hydrogen peroxide and 5,5'-dithiobis (nitrobenzoic acid). *Klin Lab Diagnostika*. 2006; (6): 13–6 [Russian].
15. Yusupova L.B. On increasing the accuracy of determination of glutathione reductase activity in erythrocytes. *Lab Delo*. 1989; (4): 19–21 [Russian].
16. Ashmarin I.P., Vasiliev I.P., Ambrosov V.A. Quick methods for statistical processing and experiment designing. Leningrad; 1975. 76 p. [Russian].
17. Ramazanov V.V., Bondarenko V.A. Osmotic properties of erythrocytes frozen in media containing non-penetrating and penetrating cryoprotectants. *Problems of Cryobiology*. 2010; 20(1): 47–58 [Ukrainian].
18. Bartosz G., Niewiarowska J., Judkiewicz L. Decreased deformability in aging erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1982; 693(1): 262–4.
19. Imanishi H, Nakai T, Abe T, Takino T. Glutathione-linked enzyme activities in red cell aging. *Clin Chim Acta*. 1986; 159(1): 73–6.

*Матеріал надійшов
до редакції 10.04.2013*