

## **ВЕТЕРИНАРНІ НАУКИ. ДІАГНОСТИКА І ТЕРАПІЯ ТВАРИН**

**Первушина О.А.**

*аспірант;*

**Жегунов Г.Ф.**

*доктор биологических наук, профессор,*

*Харьковская государственная зооветеринарная академия*

### **МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ СОБАКИ НА ЭТАПАХ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ С ГИДРОКСИЭТИЛКРАХМАЛОМ**

В комплексе лечения ряда заболеваний компанейских животных переливание крови имеет очень большое значение. Поэтому, переливание крови и её компонентов в ветеринарной практике с каждым годом приобретает всё большее распространение. Показаниями к переливанию чаще служит анемии, острая кровопотеря, нарушение свертываемости крови и другие не малозначимые факторы. В связи с этим актуальным является изучение механизмов криоповреждения и криозащиты эритроцитов, что позволит разработать низкотемпературные технологии сохранности клеток и в дальнейшем создать банк крови.

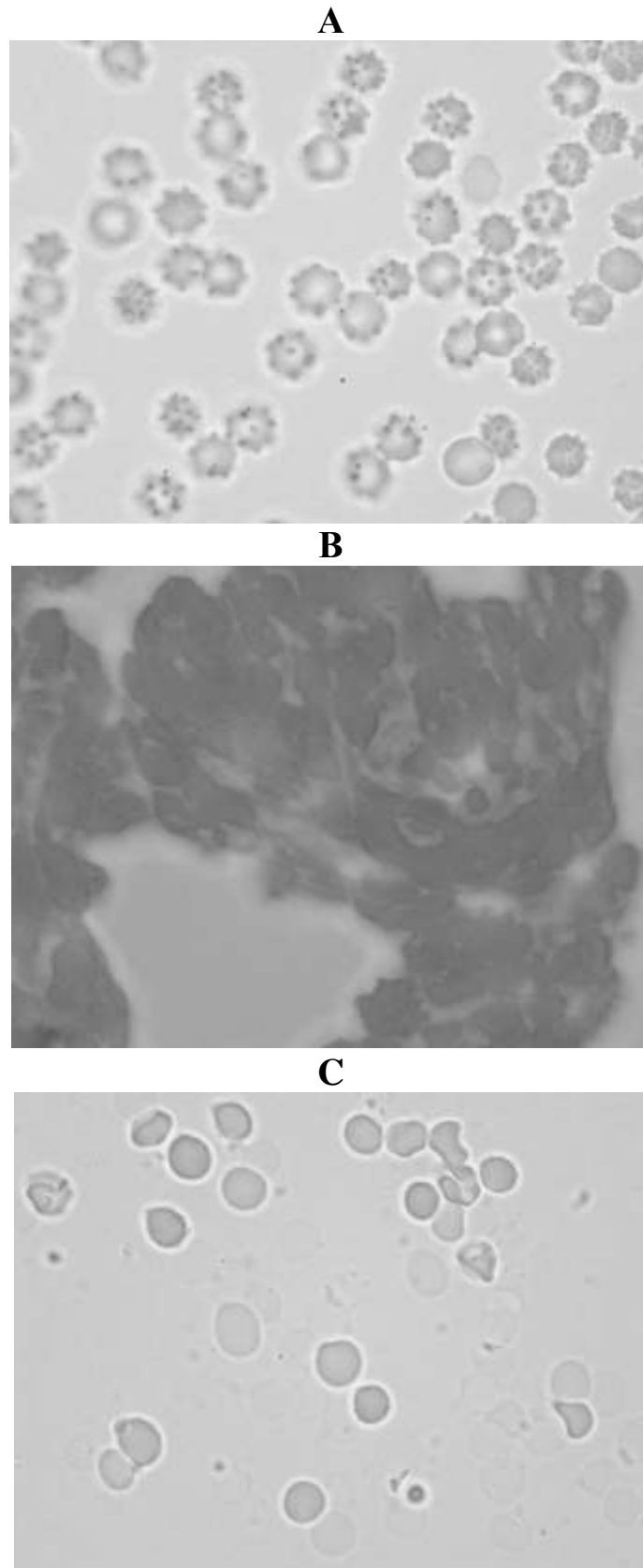
На этапах низкотемпературного консервирования эритроциты подвергаются влиянию различных физико-химических факторов, которые способны изменять структурно-функциональные характеристики мембран эритроцитов, а следовательно их объем и форму. Значительная морфологическая трансформация эритроцитов человека и животных в процессе замораживания-отогрева из дискоидной в другие формы клеток отражается на их сохранности, жизнеспособности, приживаемости и продолжительности циркуляции в сосудистом русле реципиента [6]. Поэтому важной и актуальной задачей является изучение морфологических характеристик эритроцитов животных на этапах низкотем-

пературного консервирования, что даст возможность быстро оценивать качество размороженных клеток крови.

Цель работы – исследовать морфологию эритроцитов собаки до и после замораживания – отогрева в криозащитном растворе, содержащим непроникающий криопротектор гидроксиэтилкрахмал (ГЭК).

Материалом для исследования служили эритроциты собаки. Кровь заготавливали на глюкозо-цитратном консерванте. ГЭК был выбран в качестве криопротектора так как он является производным крахмала, не токсичен, используется в качестве кровезаменителя. Кроме этого имеются литературные данные об успешном его применении в качестве криопротектора. Эритроциты осаждали центрифугированием при 750 g 5 мин. После удаления плазмы эритроциты трижды промывали 5-кратным объемом изотонического солевого раствора (150 mM NaCl, 10 mM трис – HCl, pH 7,4). Для криоконсервирования эритроцитов использовалась среда, содержащая: 17,5% ГЭК, 150 mM NaCl, 10 mM трис – HCl, pH 7,4; Раствор криопротектора смешивали с эритро массой в соотношении 1:1 и выдерживали 30 мин. при 22<sup>0</sup>C. Исследуемые образцы замораживали в микротюбиках «EPENDORFF» объемом 2 и 5 мл путем погружения в жидкий азот. Образцы отогревали на водяной бане при температуре 40-42<sup>0</sup>C. Морфологические исследования проводили методом световой микроскопии с фотографической регистрацией морфологической картины крови.

Анализ экспериментальных данных показал, что после трехкратного отмывания эритроцитов животных физиологическим раствором NaCl от плазмы и лейкотромбоцитарного слоя большая часть клеток хорошо сохранялась, но трансформировалась в эхиноциты (рис. 1, а). Инкубация эритроцитов собак с 17,5% раствором ГЭК приводила к агрегации эритроцитов (рис. 1, б). Так как, после экспозиции эритроцитов в 17,5% растворе ГЭК наблюдалась агрегация эритроцитов животных, то нами после размораживания клеток, было проведено их отмывание от непроникающего криопротектора (0,6 M NaCl, 10 mM трис – HCl, pH 7,4). Установлено, что после удаления криопротектора эритроциты собаки дезагрегировали и трансформировались в сфероциты (рис. 1, с).



**Рис. 1. Морфология эритроцитов собаки после отмывания изотоническим раствором NaCl, рН 7,4(а), после инкубации в 17,5% водном растворе ГЭК (b), после криоконсервирования и удаления криопротекторов 17,5% растворе ГЭК(с)**

Таким образом, установлено, что инкубация с ГЭК приводит к агрегации эритроцитов, однако без нарушения их целостности. Удаление криопротектора после замораживания-отогрева вызывает дезагрегацию и образование деформированных клеток неправильной формы, при этом, как и в случае инкубации, гемолиз эритроцитов был минимальным. Итак, морфологические исследования свидетельствуют о достаточной сохранности эритроцитов после действия ГЭК и замораживания-отогрева.

### **Список использованной литературы:**

1. Бабийчук Л.А. Конформационные изменения эритроцитов под влиянием криопротектора ПЭО-1500 / Л.А. Бабийчук // Проблемы криобиологии. – 1997. – № 1-2. – С. 95-99.
2. Кулешова Л.Г., Розанов Л.Ф. Изучение кинетики взаимодействия эритроцитов человека с криопротекторами и солями // Криобиология и криомедицина. – 1980. – №7. – С. 40–44
3. Морфо-функциональное состояние эритроцитов, криоконсервированных с глицерином и поливинилпирролидоном, на протяжении 5 дней хранения при  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$  / М.М. Петров, О.В. Кушко, Л.Н. Блоцкая [и др.] // Криобиология и криомедицина. – 1980. – Вып. 6. – С. 50-53.
4. Bessis M. Living Blood cells and their Ultrastructure.- Berlin: Springer-1973.
5. Christopher M , Lee SE . Red cell morphologic alterations in cats with hepatic disease. Vet Clin Pathol 1994; 23: 7-12.
6. Jaroszynski W., Keslinka E., Wujtewicz M., et al. Effect of hydroxyethyl starch (HAES) on degree and kinetics of erythrocyte aggregation studied with dielectric spectroscopy method // Med Sei Monit. 2002; 8(7): P.272-278.
7. Jay A. W. Geometry of the human erythrocyte. I. Effect of albumin on cellgeometry // Biophys. J. – 1975. – V. 15(3). – P. 205-222.119.
8. Kim H., Tanaka S., Une S. et al Y. A comparative study of the effects of glycerol and hydroxyethyl starch in canine red blood cell cryopreservation // J Vet Med Sci. 2004 Dec; 66(12): 1543-1547.