

# БІОЛОГІЧНІ НАУКИ

УДК 57.086.13:612.111:623

## ВЛИЯНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ НА СОХРАННОСТЬ И ОСМОТИЧЕСКУЮ ХРУПКОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ ЖИВОТНЫХ-КОМПАНЬОНОВ

Первушина О.А., Жегунов Г.Ф., Якименко Т.И.

Харьковская государственная зооветеринарная академия

В работе исследована степень сохранности и осмотическая хрупкость эритроцитов собаки, кошки и лошади после замораживания – отогрева под защитой комбинированных криопротекторов (ГЭК + ДМСО).. Показано, что эритроциты всех видов исследуемых животных после замораживания – отогрева демонстрируют более высокую осмотическую хрупкость. Комбинирование проникающего и непроникающего криопротектора способствовало снижению осмотического стресса при замораживании.

**Ключевые слова:** эритроциты, гемолиз, диметилсульфоксид, гидроксипропилоккрахмал, глицерин, криоконсервирование, осмотическая хрупкость.

**Актуальность проблемы.** Долгосрочное хранение биологических объектов в условиях криоконсервирования имеет важное значение, как для медицины, так и для ветеринарии [1]. В настоящее время разработаны эффективные методы криоконсервирования эритроцитов человека, однако для животных таких технологий нет.

Имеются работы, в которых показано, что глицерин малоэффективен при криоконсервировании эритроцитов млекопитающих, а диметилсульфоксид (ДМСО) в 10% концентрации может защищать эритроциты в процессе замораживания – отогрева [2]. Однако ДМСО в больших концентрациях оказывает цитотоксическое влияние на клетки. Гидроксипропилоккрахмал (ГЭК) является перспективным криопротектором для криоконсервации эритроцитов, так как является нетоксичным плазмозаменителем и в отличие от ДМСО и глицерина не требует трудоемкого удаления из клеток.

В последнее время широкое применение находят комбинированные криопротекторы (проникающие и непроникающие). Такие комбинации позволяют снизить концентрацию проникающих криопротекторов, что обеспечивает сохранение осмотической устойчивости клеток при замораживании – отогреве и позволяет упростить отмывание эритроцитов после замораживания. В работе были использованы не только ГЭК, но и его комбинации ДМСО + ГЭК, глицерин + ГЭК, что позволило снизить концентрацию проникающих криопротекторов, тем самым снизить токсический эффект и предотвратить гиперосмотический шок.

Известно, что осмотические явления, связанные с переносом различных веществ через избирательно проницаемые мембраны, вносят значительный вклад в повреждение и защиту клеток на различных этапах криоконсервирования [1]. Поэтому изучали осмотическую хрупкость, что является одним из критериев оценки сохранности мембран эритроцитов после воздействия экстремальных факторов. Представляло интерес провести сравнительное исследование устойчивости эритроцитов собаки, кошки и лошади к факторам низкотемпературного воздействия.

**Цель работы.** Исследование сохранности и осмотической хрупкости эритроцитов домашних животных после замораживания – отогрева под защитой комбинированных криопротекторов.

**Материалы и методы.** Материалом исследования служили эритроциты лошади, собаки и кошки. Животные были здоровыми, половозрелыми самцами. Манипуляции с животными проводили согласно Международным принципам Европейской конвенции о защите позвоночных животных (Страсбург, 1985 г.).

Кровь заготавливали на глюкозо-цитратном консерванте и хранили не более 4 часов при 4°C до проведения экспериментов. 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 использовали следующие криоконсервирующие среды:

1. 15% ДМСО, 25% ГЭК, 150 mM NaCl, 10 mM трис – HCl, pH 7,4;
2. 15% Глицерин, 25% ГЭК 150 mM NaCl, 10 mM трис – HCl, pH 7,4;
3. 35% ГЭК, 150 mM NaCl, 10 mM трис – HCl, pH 7,4;

Раствор криопротекторов смешивали с эритроцитом в соотношении 1:1 и выдерживали 15 мин при 22°C для эритроцитов лошади, 20 мин – для кошки и 30 мин – для собаки. Замораживание осуществляли в микротюбиках «EPENDORFF» объемом 5 мл и 2 мл. Размораживание проводили на водяной бане (40-42°C).

Уровень гемолиза определяли спектрофотометрически при 543 нм [9]:

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

где,  $A_1$  – оптическая плотность исследованной пробы

$A_2$  – оптическая плотность при полном гемолизе контрольной пробы

Криопротектор удаляли путем серийного центрифугирования. На первом этапе к суспензии эритроцитов добавляли равный объем 0,6 M

NaCl, 10 mM трис – HCl, pH 7,4. После этого эритроциты дважды промывали 150 Мм NaCl, 10 mM трис – HCl, pH 7,4.

Осмотическую хрупкость определяли по методу [3], оценивая устойчивость клеток в гипотонических растворах NaCl в интервале от 0,1% до 0,9%.

Экспериментальные результаты представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Различия между группами считали статистически достоверными при  $P < 0,05$ .

**Результаты исследования.** Основным критерием оценки целостности и сохранности эритроцитов является степень гемолиза после экстремальных воздействий [1]. Поэтому представляло интерес изучить уровень гемолиза эритроцитов лошади, собаки и кошки после замораживания – отогрева и удаления проникающего криопротектора.

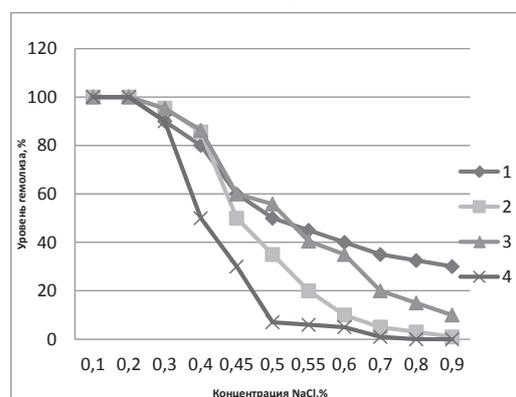
В табл. 1 представлен уровень гемолиза различных видов эритроцитов после замораживания – отогрева и удаления криопротектора.

Из таблицы видно, что для эритроцитов лошади наиболее успешной оказалась первая комбинация, уровень гемолиза после замораживания – отогрева составил 4,44%, а после удаления криопротектора – 18,5%. Для эритроцитов собаки высокий уровень сохранности клеток обеспечил ГЭК в 17,5% концентрации, уровень гемолиза при этом составил 8,9%. Вторая комбинация криопротекторов также обеспечивает высокий уровень сохранности, гемолиз при этом составил 15,34%, но удаление криопротектора оказывает негативное влияние на клетки и гемолиз при этом составил 46,02%. Для эритроцитов кошки высокую защиту после процедур замораживания – отогрева оказала вторая комбинация. Уровень гемолиза при этом составил 8,46%, а после удаления криопротектора 25,14%, что является допустимой нормой при отмывании клеток. Следует отметить, что процесс удаления криопротектора во всех случаях после замораживания – отогрева приводит к значительному повышению уровня гемолиза, что говорит о наличии скрытых повреждений клеток, которые проявляются только после отмывания.

Эритроциты в русле крови должны выдерживать различные механические напряжения, возникающие при движении по капиллярам. Показателем, отражающим пластические свойства эритроцитов, является индекс осмотической хрупкости. Определение этого показателя предполагает изучение поведения клеток в гипотонических растворах.

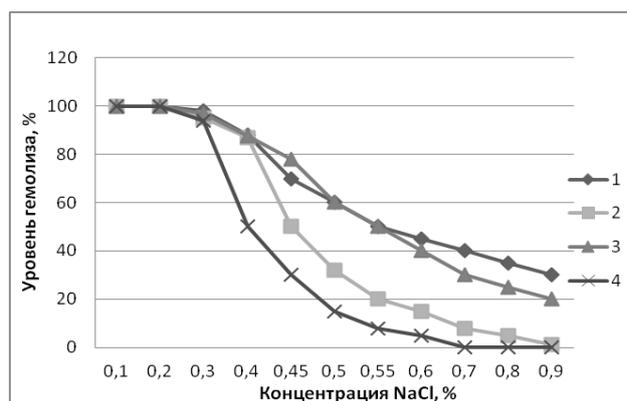
На рис. 1, 2, 3 представлены кривые осмотической хрупкости эритроцитов собаки, кошки и лошади. Клетки, криоконсервированные под защитой комбинированного криопротектора (ДМСО + ГЭК) отвечают на осмотические воздействия незначительными изменениями, тогда

как рост осмотической хрупкости наблюдается при использовании 17,5% ГЭК и 7,5% глицерин + 12,5% ГЭК, что видно из сдвига кривой лизиса эритроцитов в гипотонических растворах в сторону увеличения концентрации NaCl.



1. Клетки, криоконсервированные под защитой 17,5% ГЭК;
2. Клетки, криоконсервированные под защитой 7,5% ДМСО + 12,5% ГЭК;
3. Клетки, криоконсервированные под защитой 7,5% глицерин + 12,5% ГЭК;
4. Контрольные клетки

Рис. 1. Кривые осмотической хрупкости эритроцитов собаки



1. Клетки, криоконсервированные под защитой 17,5% ГЭК;
2. Клетки, криоконсервированные под защитой 7,5% ДМСО + 12,5% ГЭК;
3. Клетки, криоконсервированные под защитой 7,5% глицерин + 12,5% ГЭК;
4. Контрольные клетки

Рис. 2. Кривые осмотической хрупкости эритроцитов кошки

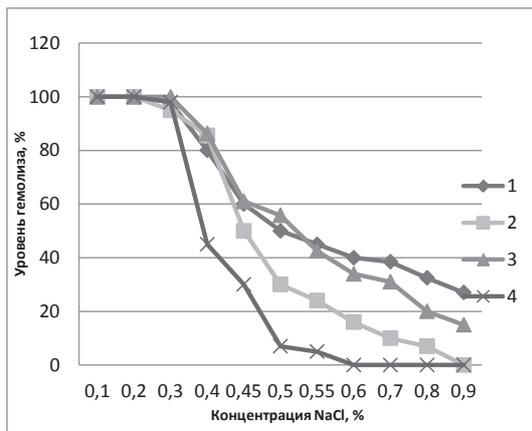
Подобное поведение кривых осмотической хрупкости было выявлено для эритроцитов, замороженных в среде с трегалозой или дек-

Таблица 1

Уровень гемолиза эритроцитов после замораживания – отогрева (ЗО) и удаления криопротектора (УК), %

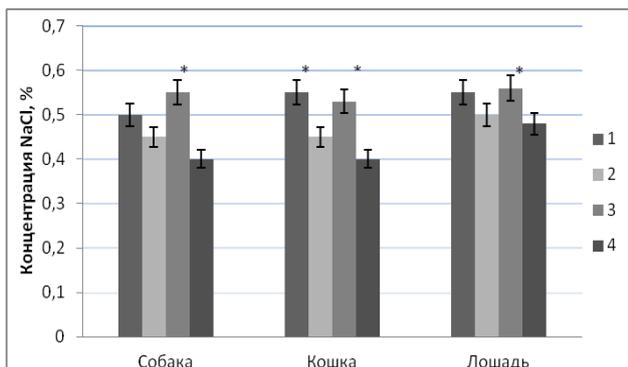
Эритроциты	Комбинации криопротекторов (конечные концентрации)				
	7,5% ДМСО + 12,5% ГЭК I		7,5% глицерин + 12,5% ГЭК II		17,5% ГЭК III
	ЗО	УК	ЗО	УК	ЗО
Лошади	4,44 $\pm$ 0,26	18,5 $\pm$ 1,36	14,58 $\pm$ 1,48	43,88 $\pm$ 4,62	13,44 $\pm$ 1,37
Собаки	32 $\pm$ 2,34	94,34 $\pm$ 1,38	15,34 $\pm$ 1,69	46,02 $\pm$ 2,06	8,9 $\pm$ 0,98
Кошки	38,62 $\pm$ 1,98	98,92 $\pm$ 2,57	8,46 $\pm$ 0,48	25,14 $\pm$ 1,56	16,2 $\pm$ 1,85

страном [10]. То есть это подтверждает то, что полученный эффект выявляется только после замораживания эритроцитов в средах с непрозрачными криопротекторами.



1. Клетки, криоконсервированные под защитой 17,5% ГЭК;
2. Клетки, криоконсервированные под защитой 7,5% ДМСО + 12,5% ГЭК;
3. Клетки, криоконсервированные под защитой 7,5% глицерин + 12,5% ГЭК;
4. Контрольные клетки

Рис. 3. Кривые осмотической хрупкости эритроцитов лошади



1. Клетки, криоконсервированные под защитой 17,5% ГЭК;
  2. Клетки, криоконсервированные под защитой 7,5% ДМСО + 12,5% ГЭК;
  3. Клетки, криоконсервированные под защитой 7,5% глицерин + 12,5% ГЭК;
  4. Контрольные клетки
- n = 5, \*p < 0,05 (по сравнению с контролем).

Рис. 4. Индекс осмотической хрупкости эритроцитов собаки, кошки и лошади

Можно сделать заключение, что степень повреждения у всех исследуемых типов клеток, криоконсервированных под защитой не только комбинированных криопротекторов, но и однокомпонентного,

достаточно высок. Однако включение в среду ДМСО несколько уменьшает этот показатель.

На рис. 4 показан индекс осмотической хрупкости, определенный как концентрация NaCl при которой происходит 50% гемолитиз. Из этого рисунка видно, что эритроциты отвечают сходно на действие гипотонии после действия факторов криоконсервации – увеличивают осмотическую хрупкость. Установлено, что ДМСО положительно влияет на коэффициент осмотической хрупкости изученных видов эритроцитов. Так после процедуры криоконсервирования в его присутствии индекс осмотической хрупкости увеличивается в меньшей степени. Тогда как этот показатель для всех видов животных, криоконсервируемых под защитой 17,5% ГЭК и комбинации 7,5% глицерин + 12,5% ГЭК – значительно повышен. Для эритроцитов собаки и лошади наиболее высокий индекс отмечается при криоконсервировании эритроцитов под защитой глицерина + ГЭК, а для кошки при криоконсервировании под защитой 17,5% ГЭК. Это свидетельствует о том, что эритроциты собаки, кошки и лошади после замораживания – отогрева под защитой 17,5% ГЭК и 7,5% глицерина + 12,5% ГЭК теряют свои эластические свойства и становятся более хрупкими.

Если сравнивать видовую особенность эритроцитов, то можно сказать о том что контрольные эритроциты лошади менее осмотически устойчивы, чем клетки собаки и кошки. Возможно это связано со структурными особенностями мембранного – цитоскелетного комплекса эритроцитов [7]. Так авторами [5] при изучении белков мембран эритроцитов с помощью электрофореза было выявлено, что белок полосы 4,2, который отвечает за стабилизацию мембраны, присутствуют у собаки и кошки, однако в эритроцитах лошади выявлен дефицит этого белка. Известно [6], что его дефицит приводит к хрупкости эритроцитов.

Таким образом в работе показано, что все изученные виды эритроцитов требуют для сохранности в процессе замораживания-отогрева разные комбинации и концентрации криопротекторов, что связано с их структурными и функциональными особенностями.

**Выводы.** 1. Использование комбинированного криопротектора 7,5% ДМСО + 12,5% ГЭК для эритроцитов лошади позволяет сохранить до 80% клеток без удаления криопротектора. Для эритроцитов собаки наиболее успешным оказался 17,5% ГЭК, сохранность при этом 90%, а для кошки 7,5% глицерин + 12,5% ГЭК, сохранность – 90%.

2. Эритроциты всех исследуемых животных проявляют сходную реакцию на действие гипотонии, т.е. обладают сходными механическими свойствами. Наименее устойчивыми к гипотонической среде являются эритроциты лошади.

## Список литературы:

1. Белоус А. М. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении / А. М. Белоус, В. А. Бондаренко. – Киев: Наук. думка, 1982. – 255 с.
2. Денисова О. Н. Криоконсервирование эритроцитов животных под защитой диметилсульфоксида, полиэтиленгликоля, глицерина / Жегунов Г. Ф., Бабийчук Л. А. // Проблемы криобиологии. – 2005. – № 2. – С. 195-201.
3. Меньшиков В. В. Лабораторные методы исследования в клинике: Методы гематологических исследований / Меньшиков В. В. – М.: Медицина, 1987. – 363 с.

4. Clapisson G. Cryopreservation with hydroxyethylstarch (HES) + dimethylsulfoxide (DMSO) gives better results than DMSO alone / Clapisson G. // Bull Cancer. – 2004. – Vol. 91, № 4. – P. E97–102.
5. Guerra-Shinohara E. M., Barretto O. C. The erythrocyte cytoskeleton protein 4.2 is not demonstrable in several mammalian species / Guerra-Shinohara E. M., Barretto O. C. // Braz J Med Biol Res. (1999)32:683-687.
6. Ideguchi H. Genetic defect of erythrocyte band 4.2 protein associated with hereditary spherocytosis / Ideguchi H., Nishimura J., Nawata H. // Brit. J. Haemat. 74: 347-353.
7. Kaneko J. J. Clinical biochemistry of domestic animals / Kaneko J. J., Harvey J. W., Bruss M. – New York: Academic Press, 1989. – 932 p.
8. Kim H. A comparative study of the effects of glycerol and hydroxyethyl starch in canine red blood cell cryopreservation / Kim H. // J Vet Med Sci. 2004 Dec; 66 (12):1543-1547.
9. Mazur P., Miller R. H. Permeability of the human erythrocytes to glycerol in 1 and 2M solutions at 0 and 20°C / Mazur P., Miller R. H. // Cryobiology. – 976. – Vol. 13. – P. 507–522.
10. Pellerin-Mendes C. In vitro study of the protective effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen / Pellerin-Mendes C., Million L., Marchand-Arvier M. // Cryobiology. – 1997. – Vol. 35, № 2. – P. 173–186.

**Первушина О.А. Жегунов Г.Ф. Якіменко Т.І.**

Харківська державна зооветеринарна академія

## **ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ НА ЗБЕРЕЖЕННЯ ТА ОСМОТИЧНУ КРИХКІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ ДОМАШНІХ ТВАРИН**

### **Анотація**

У роботі досліджена ступінь збереження і осмотична крихкість еритроцитів собаки, кішки і коня після заморожування – відігрівання під захистом комбінованих криопротекторів (ГЕК + ДМСО). Показано, що еритроцити всіх видів досліджуваних тварин після заморожування – відігрівання демонструють вищу осмотичну крихкість. Комбінування проникаючого і непроникаючого криопротекторів сприяло зниженню осмотичного стресу при заморожуванні.

**Ключові слова:** еритроцити, гемоліз, диметилсульфоксид, гідроксиетилкрахмал, гліцерин, криоконсервування, осмотична крихкість.

**Pervushina O.A., Zhegunov G.F., Yakimenko T.I.**

Kharkiv State Zooveterinary Academy

## **EFFECT OF CRYOPRESERVATION ON PRESERVATION AND OSMOTIC FRAGILITY OF ERYTHROCYTES IN PETS**

### **Summary**

The degree of erythrocyte preservation and osmotic fragility in horses, dogs and cats after freezing – warming under the protection of combined cryoprotectants (HES + DMSO) has been studied. It was shown, that erythrocyte all types of test animals after freezing – thawing demonstrated a higher osmotic fragility. Combining penetrating and non-penetrating cryoprotectant contributed to the reduction of osmotic stress during freezing.

**Keywords:** erythrocytes, haemolysis, dimethylsulphoxide, hydroxiethylstarch, cryopreservation, cryoprotectors.