



Дослідження особливостей кріоконсервування еритроцитів кролика та собаки за допомогою кріопротектора диметилсульфоксид

О. Є. Ніпот¹, Н. А. Єршова¹, С. М. Федосова², О. О. Чабаненко¹,
С. С. Єршов¹, Н. М. Шпакова¹
nipotel71@gmail.com



¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61016, Україна

²Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, майдан Свободи, 4, м. Харків, 61022, Україна

ORCID:

O. E. Nipot <https://orcid.org/0000-0003-2877-8896>
N. A. Yershova <https://orcid.org/0000-0001-9332-6752>
O. O. Chabanenko <https://orcid.org/0000-0003-1977-3495>
S. S. Yershov <https://orcid.org/0000-0002-6136-1825>
N. M. Shpakova <https://orcid.org/0000-0002-0148-7522>

Authors' Contributions:

NOE: Investigation; Writing — original draft.

YNA: Investigation; Data curation;

Writing — review & editing.

FSM: Methodology; Data curation.

COO: Methodology; Data curation.

YSS: Data curation; Formal analysis; Visualization.

SNM: Project administration; Conceptualization;

Writing — review & editing.

Declaration of Conflict of Interests:

None to declare.

Ethical approval:

The experiments were carried out in accordance with the protocols approved by the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine and with the main provisions of the Law of Ukraine "On the Protection of Animals Against Cruelty" (no. 3447-IV from 21.02.2006) and "The European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes" (Strasbourg, 1986).

Acknowledgements:

None.



Attribution 4.0 International
(CC BY 4.0)

Переливання крові та її компонентів використовується у ветеринарії як при невідкладних станах, так і при хронічних хворобах. Тривале збереження еритроцитів тварин допоможе формувати банки крові й швидше реагувати на клінічні потреби. Метою роботи було дослідження рівня пошкодження еритроцитів кролика та собаки за умов їх кріоконсервування при різних концентраціях проникаючого кріопротектора диметилсульфоксиду (ДМСО) (7,5 % і 10 %) і при використанні двох об'ємів зразка, що заморожується (2 мл і 10 мл). Результати показали, що для еритроцитів обох видів ссавців рівень пошкодження є меншим при меншому об'ємі зразка та при більшій концентрації кріопротектора. Але є певні особливості, пов'язані з видом. Так ДМСО в концентрації 7,5 % зовсім не захищає еритроцити кролика, але забезпечує захист від 45 % до 60 % еритроцитів собаки, залежно від об'єму зразка (10 мл і 2 мл відповідно). Концентрація ДМСО 10 % забезпечує захист від 35 % до 76 % еритроцитів кролика і від 64 % до 73 % еритроцитів собаки для зразків 10 мл та 2 мл відповідно. Ці дані свідчать про те, що досліджуваний кріопротектор є більш ефективним для еритроцитів собаки, ніж кролика, й об'єм зразка значно менше впливає на рівень загального пошкодження цих еритроцитів. Отримані дані свідчать про актуальність розробки адаптованих протоколів кріоконсервації з урахування видових особливостей еритроцитів тварин.

Ключові слова: еритроцити ссавців, ДМСО, кріоконсервація, об'єм зразка, *Oryctolagus cuniculus*, *Canis lupus familiaris*

Вступ

Збереження клітин крові широко розповсюджене у клінічній практиці та під час наукових досліджень. Завдяки уповільненню метаболічних процесів клітини зберігають функціональність і можуть бути використані як донорські [8]. До переливання крові та її компонентів вдаються для лікування не тільки людей, а й для тварин. Домашні тварини, службові собаки, коні, велика рогата худоба є видами, що становлять найбільший інтерес для ветеринарії й потребують

переливання крові після планових операцій, у рамках процедур при онкологічних, гематологічних або серцево-судинних захворюваннях або під час травм і крововиливів [1, 9, 10, 12]. У всіх цих випадках допомога найчастіше обмежується або переливанням крові з вени у вену, або переливанням препаратів крові, зберігання яких регулюються протоколами, що були розроблені для крові людини. Найчастіше це нетривале зберігання в холодильнику. Альтернативою йому є кріоконсервація — зберігання в рідкому азоті при -196°C . Це тривале зберігання, що дозволить

формувані банки тваринної крові і швидко реагувати на клінічні потреби, не витрачаючи часу на пошуки донора.

Під час криоконсервації клітини піддають різним пошкодженням, які можна зменшити, контролюючи профілі охолодження й нагрівання, а також процедури додавання й видалення криозахисного агента. Найпоширенішими з криозахисних агентів є диметилсульфоксид (ДМСО) та гліцерин [2, 4, 8]. Однак гліцерин погано зарекомендував себе при криоконсервації еритроцитів тварин, на відміну від ДМСО [1, 11, 13].

У роботі досліджено рівень пошкодження еритроцитів кролика та собаки після криоконсервації з криопротектором ДМСО (7,5 % і 10 %) залежно від об'єму зразка (2 мл і 10 мл).

Матеріали і методи

У роботі використовували еритроцити кролика (*Oryctolagus cuniculus*) та собаки (*Canis lupus familiaris*). Заготівлю крові й усі маніпуляції проводили згідно з вітчизняними та міжнародними біоетичними нормами щодо проведення експериментів на тваринах відповідно до протоколів, схвалених комітетом з біоетики Інституту проблем криобіології і кіомедицини НАН України, узгоджених із основними положеннями Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006) та «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Збір крові у кролика здійснювали з використанням розчину гепарину (500 од/мл). Еритроцити собак були заготовлені за допомогою гемоконсерванту «Глюгіцир» («Біофарма», Україна). Цільну кров центрифугували при 800 g протягом

трьох хвилин, видаляли плазму, тоді еритроцити тричі відмивали у фізіологічному розчині (NaCl 0,15 моль/л; Na-фосфатний буфер 0,01 моль/л, pH 7,4). До суспензії еритроцитів додавали крапельно ДМСО у співвідношенні 1:1 при постійному перемішуванні, час додавання становив 5–7 хвилин, кожен наступний краплю додавали після повного змішування попередньої. Кінцева концентрація криопротектора становила 7,5 % та 10 %. Суміш інкубували протягом 20 хв при кімнатній температурі. Після інкубації зразки у пластикових контейнерах об'ємом 2 мл та 10 мл заморожували прямим зануренням у рідкий азот (–196 °C), оскільки за таких умов досягається максимально можлива швидкість заморожування. Відігрівання здійснювали на водяній бані за температури 38–40 °C до повного розморожування. Криопротектор видаляли шляхом поетапного центрифугування. На першому етапі до суспензії еритроцитів додавали в рівному обсязі розчин: NaCl 0,6 моль/л; Na-фосфатний буфер 0,01 моль/л, pH 7,4. Після цього еритроцити двічі промивали фізіологічним розчином. Вміст гемоглобіну, що вийшов у супернатант, визначали спектрофотометрично на кожному етапі. Рівень гемолізу на кожному етапі розраховували відносно кількості клітин на початку кожного етапу. Для визначення загального пошкодження розраховували рівень гемолізу відносно інтактної проби. Статистичну обробку отриманих числових даних проводили за допомогою програми *Statistica* (версія 6.0) з урахуванням t-критерію Стьюдента.

Результати й обговорення

Дані щодо пошкодження еритроцитів кролика та собаки після заморожування-відтавання представлено в табл. 1 та 2 відповідно. Окремо оцінювали

Таблиця 1. Рівень гемолізу еритроцитів кролика під час заморожування-відтавання і видалення криопротектора, % (M±m, n=6)

Table 1. The level of rabbit erythrocytes hemolysis during freezing-thawing and removal of cryoprotectant, % (M±m, n=6)

Об'єм зразка Sample volume	Заморожування Freezing	Етапи видалення криопротектора Stages of cryoprotectant removal			Загальне пошкодження Total damage
		1	2	3	
7,5 % ДМСО / DMSO					
2 мл	50±4	43±4	53±5	42±6	92±7
10 мл	79±6	32±3	37±3	41±4	95±4
10 % ДМСО / DMSO					
2 мл	9±1	10±1	7±2	2±1	24±2**
10 мл	50±5	16±2	12±3	4±1	65±4***

Таблиця 2. Рівень гемолізу еритроцитів собаки під час заморожування-відтавання і видалення криопротектора, % (M±m, n=6)

Table 2. The level of canine erythrocytes hemolysis during freezing-thawing and removal of cryoprotectant, % (M±m, n=6)

Об'єм зразка Sample volume	Заморожування Freezing	Етапи видалення криопротектора Stages of cryoprotectant removal			Загальне пошкодження Total damage
		1	2	3	
7,5 % ДМСО / DMSO					
2 мл	20±2	10±4	12±2	6±2	40±3***
10 мл	43±3	7±2	10±3	6±2	55±4****
10 % ДМСО / DMSO					
2 мл	11±3	5±1	9±2	4±2	27±4**
10 мл	23±4	5±1	7±1	5±1	36±5*.,****

Примітка. * — відмінності вірогідні, порівняно з рівнем гемолізу клітин при об'ємі зразка 2 мл за тієї ж концентрації криопротектора, P<0,05; ** — порівняно з рівнем гемолізу клітин у присутності 7,5 % ДМСО за того ж об'єму, P<0,05; *** — порівняно з рівнем гемолізу еритроцитів кролика за відповідних умов, P<0,05.

Note. * — differences are significant compared to the level of cell hemolysis at 0 °C, P<0.05; ** — compared to the level of cell hemolysis in the absence of amphiphilic compound at the same temperature, P<0.05; *** — compared to the level of hemolysis of rabbit erythrocytes under appropriate conditions, P<0.05.

рівень гемолізу після заморожування-відтавання та на кожному з етапів видалення криопротектора. Загальне пошкодження розраховували відносно контрольного зразка, який не піддавався заморожуванню. При аналізі даних як загальну тенденцію для еритроцитів обох досліджуваних ссавців можна визначити, що рівень пошкодження є меншим при меншому об'ємі зразка та при більшій концентрації криопротектора. При цьому кількісні значення рівня пошкодження є видоспецифічними. Так, використання ДМСО у концентрації 7,5 % недостатнє для будь-якого захисту еритроцитів кролика, воно забезпечує збереження від 45 % до 60 % еритроцитів собаки в залежності від об'єму зразка. Концентрація ДМСО 10 % є більш ефективною і забезпечує збереження від 35 % до 76 % еритроцитів кролика і від 64 % до 73 % еритроцитів собаки для зразків 10 мл і 2 мл відповідно. Варто звернути увагу на те, що об'єм зразка значно менше впливає на рівень загального пошкодження еритроцитів собаки, ніж кролика, й основні зміни спостерігаються на етапі заморожування.

Відомо, що еритроцити ссавців відрізняються за характеристиками трансмембранного транспорту. Так, коефіцієнт проникності ДМСО для еритроцитів собаки за різними джерелами становить $0,577 \pm 0,12 \cdot 10^{-5}$ м/с [14] та $0,9 \pm 0,09 \cdot 10^{-5}$ м/с [7], кролика — $0,309 \cdot 10^{-5}$ м/с [6]. Отже, еритроцити собаки швидше накопичують криопротектор, а для кролика той самий час може бути недостатнім. Це співвідноситься з результатами роботи [11], де вивчали вплив часу інкубації на збереженість еритроцитів деяких ссавців та показали, що час інкубації з криопротектором є видоспецифічним параметром і потребує добору, щоб збалансувати захисний і токсичний вплив криопротектора. Можна припустити, що завдяки швидшому проникненню криопротектора у клітину еритроцити собаки в більшості експериментів мають менший рівень пошкодження, ніж еритроцити кролика. Можливо, для еритроцитів кролика потрібно використовувати більш проникний криопротектор, щоб досягти того ж результату за такий самий час інкубації, чи, можливо, треба довше насичувати клітини криопротектором.

Ключовим фактором, який впливає на виживання клітин при зміні об'єму зразка можна вважати швидкість його охолодження. Зразки меншого об'єму охолоджуються швидше, що впливає на утворення кристалів та їхні характеристики. Дослідження за допомогою криомікроскопії показали, що морфологія кристалів, які утворюються під час охолодження, визначається швидкістю охолодження, причому утворення більших кристалів спостерігається за повільніших швидкостей охолодження. Великі кристали викликають більш виражене механічне руйнування заморожених клітин, порівняно з дрібними дендритними структурами, які утворюються за вищих швидкостей охолодження [3, 5]. Як показують отримані дані, об'єм зразка є більш критичним для еритроцитів кролика. Змінення об'єму зразка від 2 мл до 10 мл збільшує рівень пошкодження

цих клітин після заморожування (10 % ДМСО) у 5 разів, а сумарне пошкодження — у 2,7 раза, тоді як для еритроцитів собаки збільшення становить 2 і 1,3 раза відповідно. Отже, при збільшенні об'єму еритроцитарної маси, що заморожується, необхідно використовувати додаткові криозахисні речовини, які знижуватимуть вірогідність утворення кристалів, а саме змінюватимуть розподіл рідкої фази у клітинному і позаклітинному середовищі, підвищуватимуть в'язкість цитоплазми, зменшуючи цим вірогідність утворення кристалів і зменшуючи їх розмір.

Отже, заморожування-відтавання еритроцитів собаки та кролика виявило видоспецифічність реакції цих клітин на фактори криоконсервації, як-от концентрація криопротектора й об'єм зразка, що заморожується. Останнє продемонструвало різну чутливість еритроцитів ссавців до швидкості охолодження. Отримані дані свідчать про необхідність урахування видових особливостей еритроцитів під час розробки протоколів криоконсервації.

Джерела

1. Denysova OM, Yakymenko TI, Vashenko BB, Zhegunov GP, Prichodchenko VO, Gladka NI. The methods of cryopreservation of red blood cells of animal. *Vet Sci Technol Anim Husb Nat Managem.* 2018; 2: 65–69. DOI: 10.31890/vtp.2018.02.18. (in Ukrainian)
2. Hu Y, Liu X, Ahmad A, Chen J, Chen X, Zhang W, Tan S. Cryoprotectants for red blood cells: Evaluate safety and effectiveness by *in vitro* measures. *MedComm Future Med.* 2023; 2 (4): e67. DOI: 10.1002/mef2.67.
3. Hu Y, Liu X; Ekpo MD, Chen J, Chen X, Zhang W, Zhao R, Xie J, He Y, Tan S. Dimethylglycine can enhance the cryopreservation of red blood cells by reducing ice formation and oxidative damage. *Int J Mol Sci.* 2023; 24 (7): 6696. DOI: 10.3390/ijms24076696.
4. Klbik I, Čechová K, Milovská S, Rusnák J, Vlasáč J, Melicherčík M, Mat'ko I, Lakota J, Šauša O. Cryoprotective mechanism of DMSO induced by the inhibitory effect on eutectic NaCl crystallization. *J Phys Chem Lett.* 2022; 13 (48): 11153–11159. DOI: 10.1021/acs.jpclett.2c03003.
5. Korbetska OO. Influence diameter straw and regime of their thawing on activity enzyme in process cryopreservation boar sperm. *Biol Tvarin.* 2013; 15 (2), 71–75. Available at: <https://aminbiol.com.ua/index.php/archive/92-archive/bt2-15-2013/1579-influence-diameter-straw-and-regime-of-their-thawing-on-activity-enzyme-in-process-cryopreservation-boar-sperm> (in Ukrainian)
6. Kovalenko GV, Kovalenko IF, Linnik TP. The mechanism of DMSO, glycerol and ethylene glycol transport across rat and rabbit erythrocyte membranes. *J Karazin Kharkiv Nat Univer Ser Biol.* 2009; 878 (10): 109–116. Available at: [http://seriesbiology.univer.kharkov.ua/ukr/10\(2009\)/pdf/109.pdf](http://seriesbiology.univer.kharkov.ua/ukr/10(2009)/pdf/109.pdf)
7. Liu J, Christian JA, Critser JK. Canine RBC osmotic tolerance and membrane permeability. *Cryobiol.* 2002; 44 (3): 258–268. DOI: 10.1016/S0011-2240(02)00032-9.
8. Murray KA, Gibson MI. Chemical approaches to cryopreservation. *Nat Rev Chem.* 2022; 6 (8): 579–593. DOI: 10.1038/s41570-022-00407-4.
9. Nguyen TT, Nguyen HTQ, Dinh KN. Evaluation of stored whole blood and monitoring the health of dogs after transfusion using fresh whole blood, stored whole blood, and packed red blood cells. *World Vet J.* 2024; 14 (2): 220–227. DOI: 10.54203/scil.2024.wvj27.

10. Pervushina OA, Denysova ON, Zhegunov GF, Gladka NI, Prichodchenko VO, Yakimenko TI. Transfusion of canine cryopreserved red blood cells in treatment of babesiosis. *Biol Tvarin*. 2018; 20 (3): 77–83. DOI: 10.15407/animbiol20.03.077. (in Ukrainian)
11. Pogozhykh D, Pakhomova Y, Pervushina O, Hofmann N, Glasmacher B, Zhegunov G. Exploring the possibility of cryopreservation of feline and canine erythrocytes by rapid freezing with penetrating and non-penetrating cryoprotectants. *PLoS One*. 2017; 12 (1): e0169689 DOI: 10.1371/journal.pone.0169689.
12. Ramakant, Sarkar TK, Verma AK, Thakur V, Maurya PK, Gautam S, Varun VK, Deepak D. Clinical significance of blood transfusions in animals: A review. *Agric Rev*. 2023; R-2638: 1–7. DOI: 10.18805/ag.R-2638.
13. Ulizko P, Bobrova O, Nardid O, Vodopyanova L, Repina S. New cryoprotective media for cryopreservation of mammal erythrocytes. *Trakia J Sci*. 2019; 4: 303–307. <https://doi.org/10.15547/tjs.2019.04.001>.
14. Zhegunov GF, Denisova ON. Permeability of mammalian erythrocytes for the molecules of glycerol and DMSO and the level of cellular viability after freezing-thawing. *Rep NAS Ukr*. 2010; 12: 139–143. (in Ukrainian)

Study of the characteristics of cryopreservation of rabbit and canine erythrocytes using the cryoprotectant DMSO

O. E. Nipot¹, N. A. Yershova¹, S. M. Fedosova², O. O. Chabanenko¹, S. S. Yershov¹, N. M. Shpakova¹
nipotel71@gmail.com

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine NAS of Ukraine, 23 Pereyaslavska str., Kharkiv, 61016, Ukraine

²V. N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody sq., Kharkiv, 61022, Ukraine

Transfusion of blood and its components is used in veterinary medicine for both emergencies and chronic diseases. Long-term preservation of animal red blood cells will help to establish blood banks and respond more quickly to clinical needs. The aim of the study was to investigate the extent of damage to rabbit and dog erythrocytes during cryopreservation at different concentrations of the permeable cryoprotectant dimethyl sulfoxide (DMSO) (7.5 % and 10 %) and using two volumes of the frozen sample (2 ml and 10 ml). The results showed that for erythrocytes of both mammalian species, the level of damage is lower with a smaller sample volume and a higher concentration of cryoprotectant. However, there are certain species-specific characteristics. For example, 7.5 % DMSO does not protect rabbit erythrocytes at all, but protects 45 % to 60 % of dog erythrocytes, depending on the sample volume (10 ml and 2 ml, respectively). The 10 % DMSO provides protection of 35 % to 76 % of rabbit erythrocytes and 64 % to 73 % of dog erythrocytes for 10 ml and 2 ml samples, respectively. These data indicate that the investigated cryoprotectant is more effective for canine than for rabbit erythrocytes and that sample volume has a much smaller effect on the level of overall damage to these erythrocytes. The data obtained indicate the need to develop adapted cryopreservation protocols taking into account the species characteristics of animal erythrocytes.

Key words: Mammalian erythrocytes, DMSO, cryopreservation, sample volume, *Oryctolagus cuniculus*, *Canis lupus familiaris*