

УДК 636.7:612.111:57.086.13:615.03

О.М. Денисова*, Г.Ф. Жегунов

Кріоконсервування еритроцитів собак із використанням диметилсульфоксиду, поліетиленгліколю та сахарози

UDC 636.7:612.111:57.086.13:615.03

O.M. Denysova*, G.F. Zhegunov

Cryopreservation of Canine Erythrocytes Using Dimethyl Sulfoxide, Polyethylene Glycol and Sucrose

Реферат: У роботі досліджено захисні властивості комбінованих середовищ проникного (диметилсульфоксиду) та непроникного (поліетиленгліколю з м. м. 1500) кріопротекторів при швидкому охолодженні в рідкому азоті еритроцитів собак із використанням сольового та сахарозно-сольового середовищ. Встановлено, що застосування комбінованих розчинів кріопротекторів на основі поліетиленгліколю з м. м. 1500 (15%) та диметилсульфоксиду (2,5–10%) в сольовому середовищі недостатньо ефективне для кріоконсервування еритроцитів собак. Зменшення концентрації солі та додавання у середовище кріоконсервування непроникної у клітини сахарози сприяє підвищенню збереженості еритроцитів після розморожування. Кращі кріозахисні властивості для еритроцитів собак проявив 10%-й диметилсульфоксид на основі сахарозно-сольового середовища, при цьому спостерігалися висока збереженість клітин після заморожування-відігрівання, механічна та осмотична стійкість деконсервованих еритроцитів. Це свідчить про можливість довгострокового зберігання і застосування кріоконсервованих еритроцитів собак для трансфузій.

Ключові слова: еритроцити собак, кріоконсервування, кріопротектор, механічна стійкість, осмотична крихкість.

Abstract: Cryoprotective properties of combined media of permeable (dimethyl sulfoxide) and impermeable (polyethylene glycol with m. w. 1500) cryoprotective agents during rapid cooling in liquid nitrogen of canine erythrocytes using saline and sucrose-saline media have been investigated. It was found that the use of combined solutions of cryoprotective agents based on polyethylene glycol with m.w. 1500 (15%) and dimethyl sulfoxide (2.5–10%) in saline was not quite effective for cryopreservation of canine erythrocytes. Reducing the salt concentration and adding cell-impermeable sucrose to the cryopreservation medium increase the preservation of erythrocytes after warming. The best cryoprotective properties for canine erythrocytes were demonstrated by 10% dimethyl sulfoxide based on sucrose-saline medium, with high preservation of cells after freeze-warming, mechanical and osmotic stability of warmed erythrocytes. This indicates the possibility of a long-term storage and use of cryopreserved canine erythrocytes for transfusions.

Key words: canine erythrocytes, cryopreservation, cryoprotective agent, mechanical stability, osmotic fragility.

На сьогодні спостерігаємо частіше застосування переливання крові собакам під час терапії гематологічних, паразитарних і хірургічних захворювань, а також різного роду травм. Для трансфузій зазвичай використовують донорську кров, однак її запасів у ветеринарних лікарнях України не існує, що пояснюється відсутністю спеціальних донорів і складністю відбору крові за фенотиповими ознаками [13, 16, 41]. В екстрених випадках кров беруть від безпорідних собак, які знаходяться в розплідниках. Для переливання використовують кров, заготовлену з розчином антикоагулянта (наприклад, глюкозо-цитратний розчин). Однак у гіпотермічних умовах донорська кров зберігається недовго (для крові собаки не більше 20 діб [18, 28, 38]), при цьому досить швидко знижується її якість, що пов'язано з порушенням ряду гомеостатичних показників еритроцитів

Nowadays the blood transfusions in dogs to treat hematological, parasitic and surgical diseases, as well as various injuries have been more frequently applied. Donated blood is usually used for transfusions, but its stocks are not available in veterinary hospitals of Ukraine, that is explained by the lack of proper donors and complexity of blood sampling by phenotypic characteristics [3, 7, 37]. In emergencies, blood is collected from purebred dogs kept in kennels. Blood procured with an anticoagulant solution (*e. g.*, glucose-citrate solution) is used for transfusion. However, under hypothermia the donor blood is stored for a short time (for canine blood it is not longer than 20 days [11, 22, 34]), while its quality decreases quite rapidly, that is associated with impaired homeostatic parameters of erythrocytes during their long-term storage. In particular, there are morphological

Харківська державна зооветеринарна академія, смт Мала Данилівка, Харківська область, Україна

Kharkiv State Zooveterinary Academy, Mala Danylivka, Kharkiv region, Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Академічна, 1, смт Мала Данилівка, Україна 62341;
тел.: (+38 057) 635-74-69
електронна пошта: denysova78@yahoo.com

*To whom correspondence should be addressed:

1, Akademichna str, Mala Danylivka, Ukraine, 62341;
tel.: +380 57 635 7469
e-mail: denysova78@yahoo.com

Надійшла 16.03.2020

Прийнята до друку 08.02.2021

Received March, 16, 2020

Accepted February, 08, 2021

© 2021 O. M. Denysova, *et al.* Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

за їх тривалого зберігання. Зокрема, відбуваються морфологічні зміни клітин, спостерігається накопичення лактату, закислення середовища, зниження швидкості гліколізу, зменшення кількості 2,3-дифосфогліцеринової кислоти та аденозинтрифосфату [18, 28]. Ці порушення призводять до зменшення стійкості еритроцитів і збільшення гемолізу. Тому зазвичай переливають не цільну кров, а суспензію еритроцитів. Перевага трансфузії еритроцитів у порівнянні з цілісною кров'ю полягає у можливості контролю за кількістю еритроцитів у розчині, який вводиться, а також за мінімальною присутністю більш вразливих лейкоцитів, тромбоцитів і продуктів їх розпаду [15, 20]. При цьому необхідний для переливання загальний об'єм може бути зменшено. Створення запасів еритроцитарної маси собак не можливе під час зберігання в умовах гіпотермії. У зв'язку з цим на сьогодні зростає зацікавленість до кріоконсервування саме еритроцитів. Зберігання еритроцитів за наднизьких температур зупиняє метаболізм і, отже, запобігає прогресуючому порушенню структури та функцій ізольованих клітин. В умовах рідкого азоту еритроцити можна зберігати протягом декількох років, що дозволяє створювати запаси консервованої донорської крові різних груп і порід собак.

Існують поодинокі дослідження щодо заморожування еритроцитів собак [4, 14, 26, 27, 30]. Відомо, що гліцерол, який є класичним кріопротектором для еритроцитів людини, не ефективний під час кріоконсервування еритроцитів собак [4, 5]. Диметилсульфоксид (ДМСО) був більш ефективним при низькотемпературному зберіганні цих клітин, проте кількість пошкоджених клітин у процесі заморожування-відігрівання залишалася досить великою. Існують методи кріоконсервування еритроцитів собак із застосуванням таких непроникних кріопротекторів, як поліетиленгліколь м.м. 1500 (ПЕГ-1500) [5] і гідроксиетилкрохмаль (ГЕК) [26, 27, 30, 43]. Перевага цих методів полягає у можливості виключення етапу видалення кріопротекторів перед трансфузією. Однак недоліком таких кріопротекторів стало приховане ушкодження в деконсервованих еритроцитах, яке проявляється в зниженні осмотичної стабільності під час їх перенесення до ізотонічного середовища [21].

Існує підхід комбінування в середовищі заморожування непроникних полімерних кріопротекторів із проникними [10, 12], за якого є успішним заморожування мезенхімальних стовбурових клітин щура [35], тромбоцитів та еритроцитів людини [3, 11], гемопоетичних стовбурових клітин печінки людини [37] та деяких рос-

changes in cells, accumulation of lactate, medium acidification, decrease in glycolysis rate, reduction of the amount of 2,3-diphosphoglyceric acid and adenosine triphosphate [11, 22, 43]. These disorders lead to a decrease in the resistance of erythrocytes and an increase in hemolysis. Therefore, not the whole blood but a suspension of erythrocytes is usually transfused. The advantage of transfusion of erythrocytes over the whole blood is the ability to control the number of erythrocytes in the solution injected, as well as a minimal presence of more vulnerable leukocytes, platelets and their decay products [6, 13]. At the same time, the total volume required for transfusion can be reduced. Establishing the stocks of canine erythrocyte mass is not possible during storage in hypothermia. As a result, the interest to cryopreservation of erythrocytes is growing. Their storage at ultra-low temperatures stops the metabolism and, therefore, prevents the progressive disruption of the structure and function of isolated cells. In liquid nitrogen, erythrocytes can be stored for several years, that enables the establishing the stocks of preserved donor blood of different groups and various breeds of dogs.

There are single studies on freezing of canine erythrocytes [5, 8, 19, 20, 24]. It is known that glycerol, being a classic cryoprotective agent (CPA) for human erythrocytes, is not effective during cryopreservation of canine ones [8, 9]. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was more effective during low-temperature storage of these cells, but the number of those injured during freeze-warming remained quite large. There are methods to cryopreserve the canine erythrocytes using impermeable CPAs, such as polyethylene glycol with m.w. 1500 (PEG-1500) [8] and hydroxyethyl starch (HEC) [19, 20, 24, 39]. The advantage of these methods is the possibility of eliminating the stage of CPAs removal before the transfusion. However, the disadvantage of such CPAs is the latent damage in warmed erythrocytes, which is manifested in a reduced osmotic stability during their transfer to an isotonic environment [14].

There is an approach of combining of impermeable polymeric CPAs with permeable ones [28, 40] in the freezing medium, due to which freezing of rat mesenchymal stem cells [30], platelets and human erythrocytes [4, 31]), hematopoietic stem cells of the human liver [33] and some plants [15] is successful. Of great importance is the freezing medium composition, in particular the presence of salts and sucrose. R.B. Williams *et al.* [27]) demonstrated that the use of sucrose as an additional CPA was helpful to reduce the osmotic shock of blastomeres after warming.

лин [22]. Велике значення має і склад середовища заморожування, зокрема присутність солей і сахарози. У роботі R. B. Williams та співавт. [33] показано, що використання сахарози як додаткового кріопротектора допомагає знизити осмотичний шок бластомерів після відігрівання.

Встановлено, що найбільш вразливими при заморожуванні-відігріванні є плазматичні мембрани еритроцитів [25, 29, 34, 36, 42, 44]. У процесі кріоконсервування відбуваються зміни концентрації солей під час кристалізації та виморожування води, зміна осмолярності у процесі додавання / видалення кріопротекторів, що призводить до механічної напруги мембрани еритроцитів і цитоскелета [19, 34, 36]. Суттєвим для мембрани також є прямий механічний вплив, який створюється зростаючими кристалами льоду під час заморожування [1, 25, 42]. Основна роль підтримки стійкості еритроцитів за механічного впливу льоду належить плазматичній мембрані й білкам цитоскелетного комплексу клітин [32, 44]. Тому при подальшій трансфузії підтримка життєздатності деконсервованих еритроцитів у руслі крові багато в чому буде залежати від здатності мембран клітин витримувати значні механічні напруги під час перепадів осмотичного тиску, а також руху капілярами, розміри яких можуть бути меншими за діаметр самих еритроцитів. У зв'язку з цим оцінка осмотичної та механічної стійкості є важливими тестом якості деконсервованих еритроцитів перед застосуванням для трансфузії.

Мета роботи – вивчення кріопротекторних властивостей комбінованих сольових і сахарозно-сольових середовищ проникних і непроникних кріопротекторів під час швидкого заморожування еритроцитів собак, а також дослідження осмотичної та механічної стійкості деконсервованих еритроцитів.

Матеріали та методи

У роботі використовували такі реактиви: ПЕГ м. м. 1500, ГЕК м. м. 200, ДМСО, глюкозу («Serva», Німеччина), сахарозу, NaCl, NaH₂PO₄, H₂O, Na₂HPO₄ та інші реактиви виробництва Росії та України (х. ч. або ос. ч.).

Об'єктам дослідження стали еритроцити собак. Усі тварини були клінічно здоровими, статевозрілими безпорідними самцями (2–10 років). Експерименти проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447–IV від 21.02.2006 р.) і відповідно до Міжнародних принципів Європейської конвенції з захисту хребетних тварин (Страсбург, 1986 р.).

The most vulnerable to freeze-warming were found to be plasma membranes of erythrocytes [18, 23, 29, 32, 38, 41]. In cryopreservation there are the changes in salt concentration during crystallization and freezing of water, alteration in osmolality during adding / removing the CPAs, that leads to mechanical stress on membrane of erythrocytes and cytoskeleton [12, 29, 32]. Significant for the membrane is also a direct mechanical effect generated by growing ice crystals during freezing [1, 18, 38]. The main role in maintaining the stability of erythrocytes under the mechanical action of ice belongs to the plasma membrane and proteins of the cytoskeletal complex of cells [26, 41]. Therefore, during further transfusion, the maintenance of viability of warmed erythrocytes in bloodstream will largely depend on the ability of cell membranes to withstand significant mechanical stresses during osmotic pressure, as well as the movement of capillaries, which may be smaller than the diameter of erythrocytes. Therefore, the assessment of osmotic and mechanical stability is an important quality test for warmed erythrocytes prior to be used for transfusion.

The research aim was to study the cryoprotective properties of combined saline and sucrose-saline media of permeable and impermeable CPAs during rapid freezing of canine erythrocytes, as well as to investigate the osmotic and mechanical stability of warmed erythrocytes.

Materials and methods

The following reagents were used in the research: PEG with m.w. 1500, HEC with m. w. 200, DMSO, glucose («Serva», Germany), sucrose, NaCl, NaH₂PO₄, H₂O, Na₂HPO₄ and other reagents produced in Russia and Ukraine (chemically pure or of high purity grades).

The research subjects were canine erythrocytes. All the animals were clinically healthy, mature outbred males (2–10 years). The experiments were performed in accordance with the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty' (№ 3447–IV of February 21st, 2006) and in accordance with the International Principles of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals (Strasbourg, 1986).

Blood was collected with glucose-citrate preservative and stored not longer than 48 hours at 5°C prior to the experiments. Erythrocytes were obtained by centrifugation of the whole blood at 750g for 5 min, followed by removal of plasma and platelet layer. The erythrocytes were then washed three times with 4-fold volume of isotonic saline (150 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer, pH 7.4).



Кров заготовляли на глюкозо-цитратному консерванті та зберігали не більше 48 годин при 5°C до проведення експериментів. Еритроцити одержували методом центрифугування цільної крові при 750g протягом 5 хв із подальшим видаленням плазми та лейкоцитомбоцитарного шару. Після цього еритроцити тричі відмивали в 4-кратному об'ємі ізотонічного сольового розчину (150 mM NaCl, 10 mM фосфатного буфера, pH 7,4).

Було приготовано такі розчини кріопротекторів: сольове середовище (на основі 150 mM NaCl, 10 mM фосфатного буфера) та сахарозно-сольове середовище (на основі 200 mM сахарози, 50 mM NaCl, 10 mM фосфатного буфера, pH 7,4). Кріоконсерванти додавали до суспензії еритроцитів у співвідношенні 1:1 за об'ємом. Тривалість інкубації еритроцитів у цих середовищах перед заморожуванням становила 20 хв за кімнатної температури (22°C). Зразки заморожували в кріопробірках об'ємом 10 мл («Eppendorf», Німеччина) шляхом занурення у рідкий азот (протокол швидкої заморозки). Швидкість охолодження в таких умовах становить 2,5 °C/с [39]. Відігрівання зразків проводили шляхом перенесення контейнера з рідкого азоту у водяну ванну (40–42°C) із постійним струшуванням. Зразки повністю відтавали приблизно за 50–60 с. Видалення проникних кріопротекторів здійснювали послідовними етапами центрифугування при 750g: 1 – відмивання рівним об'ємом розчину 600 mM NaCl, 10 mM фосфатним буфером, pH 7,4; 2 й 3 – відмивання рівними об'ємами розчином 150 mM NaCl, 10 mM фосфатного буфера, pH 7,4. Гемоліз визначали методом спектрофотометрії («СФ-46», Росія) за кількістю гемоглобіну, який вийшов із клітин. Кількість гемоглобіну виражали у відсотках по відношенню до 100% гемолізу еритроцитів.

Осмотичну крихкість визначали за методом N. C. Jain [24]: оцінювали стабільність клітин у гіпотонічних розчинах NaCl від 0,1 до 0,9%. Індекс осмотичної крихкості визначали як концентрацію NaCl, за якої відбувається 50%-й гемоліз.

Стійкість еритроцитів до механічного стресу оцінювали за рівнем гемолізу під впливом дрібних кульок, які перемішувалися у суспензії відповідно до методу, описаному у роботі Н. Г. Землянських [7]. Деконсервовані еритроцити (1 мл) переносили у розчин 150 mM NaCl, 10 mM фосфатного буфера, pH 7,4 (5 мл) у пластикових стаканчиках (кінцевий гематокрит приблизно 15%). У стаканчики обережно вносили 50 пластикових кульок (діаметр 5 мм, маса 1,5 г) і магнітну паличку.

The following CPA solutions were prepared: saline (based on 150 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer) and sucrose-saline medium (based on 200 mM sucrose, 50 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer, pH 7.4). Cryopreservatives were added to erythrocyte suspension in 1: 1 ratio (v/v). The duration of incubation of erythrocytes in these media before freezing was 20 min at room temperature (22°C). Samples were frozen in 10 ml cryotubes (Eppendorf, Germany) by an immersion into liquid nitrogen (rapid freezing protocol). The cooling rate in such conditions is 2.5 °C / s [35]. The samples were warmed by transferring the liquid nitrogen container to a water bath (40–42°C) with constant shaking. The samples were completely thawed in about 50–60 s. Permeable CPAs were removed in successive stages of centrifugation at 750g: 1 – washing with an equal volume of 600 mM NaCl solution, 10 mM phosphate buffer, pH 7.4; 2 and 3 – washing in equal volumes with a solution of 150 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer, pH 7.4. Hemolysis was spectrophotometrically determined (SF-46, Russia) on the amount of hemoglobin released from the cells. The hemoglobin amount was expressed as a percentage relative to 100% hemolysis of erythrocytes.

Osmotic fragility was determined by the method of N.C. Jain [17], namely the stability of cells in hypotonic NaCl solutions from 0.1 to 0.9% was assessed. The index of osmotic fragility was defined as NaCl concentration at which 50% hemolysis occurs.

The resistance of erythrocytes to mechanical stress was assessed by the hemolysis level under the influence of small balls, which were mixed in suspension according to the method described by N.G. Zemlianskykh [42]. Warmed erythrocytes (1 ml) were transferred into a solution of 150 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer, pH 7.4 (5 ml) in plastic cups (final hematocrit was approximately 15%). Fifty plastic balls (of 5 mm diameter and 1.5 g weight) and a magnetic rod were carefully placed into the cups. The erythrocyte suspension with plastic beads was mixed by means of a magnetic stirrer (MM-5, Ukraine) at a speed of 750g for 30 minutes. To determine hemolytic damage, the aliquots of cells were centrifuged at 750g and the supernatant was removed, wherein the hemolysis level was determined as described above.

The results were statistically processed using the Statgraphics Plus 2.1 software (Manugistic Inc.; STATistical GRAPHICs system, USA). Data are presented as $M \pm SE$ (mean \pm standard error). The significance of the differences between experimental groups was assessed using a multi-scale Fisher's test according to grouping the samples with the least

Суспензію еритроцитів із пластиковими кульками перемішували за допомогою магнітної мішалки («ММ-5», Україна) зі швидкістю 750g протягом 30 хв. Для визначення гемолітичних ушкоджень аліквоти клітин центрифугували при 750g і відбирали супернатант, у якому визначали рівень гемолізу як описано вище.

Статистична обробка результатів виконана з використанням програмного пакета «Statgraphics Plus 2.1» («Manugistic Inc.; STATistical GRAPHICS system», США). Дані представлено у вигляді $M \pm SE$ (середнє значення \pm стандартна помилка). Статистичну значущість відмінностей між експериментальними групами оцінювали за допомогою множинного рангового тесту Фішера за процедурою угруповання вибірок із найменшою значущою різницею. У кожній серії проведено не менше 6 дослідів.

Результати та обговорення

Вибір оптимальних кріопротекторів, їх комбінацій і концентрацій є вирішальним фактором для забезпечення високого виживання при кріоконсервуванні еритроцитів.

Вперше ДМСО у якості кріопротектора запропонували використовувати J. Lovelock і M. Bishop [31]. Кріопротектор було застосовано для кріоконсервування (-196°C) еритроцитів людини С.Е. Huggins [23]. Також відомо, що ДМСО є токсичною речовиною [9, 17], тому його необхідно відмивати після розморожування клітинної суспензії. Це ускладнює отримання якісних деконсервованих клітин і призводить до втрати частини клітин у процесі відмивання. За даними Е.Е. Rosenbaum [40] токсичність ДМСО на рівні організму має видову специфічність. Середня летальна доза (ЛД₅₀, г/кг) при внутрішньовенному введенні для кроликів, мавп, лабораторних мишей і собак становить 19,2; 11,0; 3,8 і 2,5 г/кг маси відповідно. Всесвітня організація охорони здоров'я в останні роки ХХ століття дозволила застосування ДМСО у якості кріопротектора з обов'язковим відмиванням заморожених під його захистом матеріалів перед використанням.

З метою зниження токсичної дії кріопротектора було досліджено комбіновані розчини на основі непроникного ПЕГ-1500 (15%) і проникного ДМСО (2,5–10%) кріопротекторів. Розрахунок на успіх такого підходу пояснюється тим, що під час додавання, а також видалення проникних кріопротекторів відбувається порушення осмотичної рівноваги клітин, яке можна значно знизити за допомогою одночасного додавання непроникного кріопротектора або сорбітолу/

significant difference. At least 6 experiments were performed in each series.

Results and discussion

The choice of optimal CPAs, their combinations and concentrations is a decisive factor in ensuring a high survival in cryopreservation of erythrocytes. For the first time DMSO as a CPA was proposed for usage by J. Lovelock and M. Bishop [25]. С.Е. Huggins [16] used CPA for cryopreservation (-196°C) of human erythrocytes. It is also known that DMSO is a toxic substance [10, 21], so it must be washed after the cell suspension thawing. This complicates the obtaining of qualitative warmed cells and leads to the loss of some cells when washing. According to E.Е. Rosenbaum [36], the DMSO toxicity at the level of an organism has species specificity. The average lethal dose (LD₅₀, g/kg) when administered intravenously to rabbits, monkeys, laboratory mice and dogs is 19.2; 11.0; 3.8 and 2.5 g/kg body weight, respectively. In the last years of the twentieth century, the World Health Organization allowed the use of DMSO as a CPA with mandatory washing of cryopreserved specimens under its protection before use.

To reduce the toxic effect of CPAs, the combined solutions based on impermeable PEG-1500 (15%) and permeable DMSO (2.5–10%) CPAs were studied. Considering this approach to be successful is explained by the fact that during the supplementing and removal of permeable CPAs the osmotic balance of cells is disordered, that can be significantly reduced by adding impermeable CPA or sorbitol / sucrose [44]. The use of combined CPAs involves ensuring an optimal dehydration of cells and minimizing the changes in their volume during freeze-warming. Rapid freezing by an immersion of the containers into liquid nitrogen was chosen as the most optimal cryopreservation method to be used in cryobanks. The most effective penetrating CPA during cryopreservation of canine erythrocytes is DMSO [9], and the promising one for freezing human erythrocytes is PEG-1500 [2].

The Table shows the level of erythrocytes' hemolysis after cryopreservation under protection of impermeable (15% PEG-1500) and various concentrations of permeable (2.5–10% DMSO) CPAs. Immediately after thawing, a high rate of erythrocyte preservation was observed in almost all freezing options. However, after the CPA removal, which must be performed before the use of warmed erythrocytes in clinical practice, the degree of cell injury increased sharply in all the samples with PEG-1500. In the medium, which contained only



Рівень гемолізу еритроцитів після криоконсервування під захистом проникного (ДМСО) і непроникного (ПЕГ-1500) криопротекторів
Level of erythrocyte hemolysis after cryopreservation with permeable (DMSO) and impermeable (PEG-1500) CPAs

Середовище Medium	Концентрація криопротектора, % CPA concentration, %		Гемоліз, % Hemolysis, %	
	ДМСО DMSO	ПЕГ-1500 PEG-1500	Після розморожування After warming	Після видалення криопротектора After CPA removal
Сольове Saline	2,5	15	7,12 ± 0,72	99,76 ± 0,24
	5	15	20,25 ± 9,20	95,10 ± 1,13
	7,5	15	22,53 ± 3,02	76,01 ± 6,13
	10	15	5,73 ± 1,93	44,17 ± 4,62
	10	–	22,08 ± 2,90	27,03 ± 5,19
Сахарозно- сольове Sucrose- saline	2,5	15	13,77 ± 6,09	95,46 ± 3,27
	5	15	4,17 ± 0,21	92,94 ± 1,53
	7,5	15	6,52 ± 2,60	98,06 ± 1,31
	10	15	5,14 ± 1,28	43,54 ± 5,3
	10	–	13,42 ± 2,22	16,2 ± 2,31

Примітка: дані представлено у вигляді $M \pm m$ із 6 незалежних експериментів, $p < 0,05$.

Note: the data are presented as $M \pm m$ among 6 independent experiments, $p < 0.05$.

сахарози [6]. Застосування комбінованих криопротекторів передбачає забезпечення оптимальної дегідратації клітин і мінімізацію зміни їх об'єму в процесі заморожування-відігрівання. Було обрано швидке заморожування шляхом занурення контейнерів у рідкий азот, як найбільш оптимальний метод криоконсервування для використання в криобанках. Найефективнішим проникним криопротектором під час криоконсервування еритроцитів собак є ДМСО [5], а перспективним для заморожування еритроцитів людини – ПЕГ-1500 [2].

У таблиці представлено рівень гемолізу еритроцитів після криоконсервування під захистом непроникного (15% ПЕГ-1500) і різних концентрацій проникного (2,5–10% ДМСО) криопротекторів. Відразу після розморожування спостерігався високий рівень збереження еритроцитів майже в усіх варіантах заморожування. Однак після процедури видалення криопротекторів, яку необхідно робити перед застосуванням деконсервованих еритроцитів у клінічній практиці, ступінь пошкодження клітин різко збільшувалася у всіх пробах із ПЕГ-1500. У середовищі, яке містило тільки 10% ДМСО, ступінь пошкодження клітин значно менший як після розмо-

10% DMSO, the degree of cell damage is much lower both after thawing and after the CPA removal. During the use of sucrose-saline medium, the level of hemolysis after freeze-warming was further reduced. The decrease in salt concentration and increase in sucrose one in the CPA solution favorably affected the preservation of cells in freeze-warming.

Thus, the use of a combination of permeable DMSO and impermeable PEG-1500 during rapid freezing was not effective for the protection of canine erythrocytes against adverse factors of low-temperature preservation. This is confirmed by the data of N.G. Zemlianskykh *et al.* [43], wherein it has been shown that if PEG-1500 is used for cryopreservation of human erythrocytes, the asymmetry of the distribution of phosphatidylserine in the membrane is disordered, that indicates its sublethal damage. Therefore, the use of combined solutions using PEG-1500 does not protect cells against an injury to erythrocyte membranes and should not be used in cryopreservation protocols for canine erythrocytes.

Figure 1 comparatively shows the degree of injury to canine erythrocytes after freeze-warming under protection of impermeable PEG-1500, HEC and permeable DMSO CPAs. Immediately after thawing, the impermeable CPA PEG-1500 showed the best cryoprotective properties, but after removal of CPA with NaCl saline, the level of hemolysis increased sharply. It is known [2] that PEG-1500 does not need to be removed before transfusion, but the cells enter an isotonic environment in the bloodstream, in which they can be severely damaged. Probably, the presence of PEG-1500 masks the presence of a hidden damage.

Permeable DMSO allows to keep the canine erythrocytes at a fairly high level during freeze-warming [9]. Therefore, we used this CPA in 10% concentration, and to optimize the freezing conditions, different amounts of salt and sucrose were added to the freezing medium. After freeze-warming in an isotonic environment, the water is headed towards the cells saturated with CPA [44]). In this

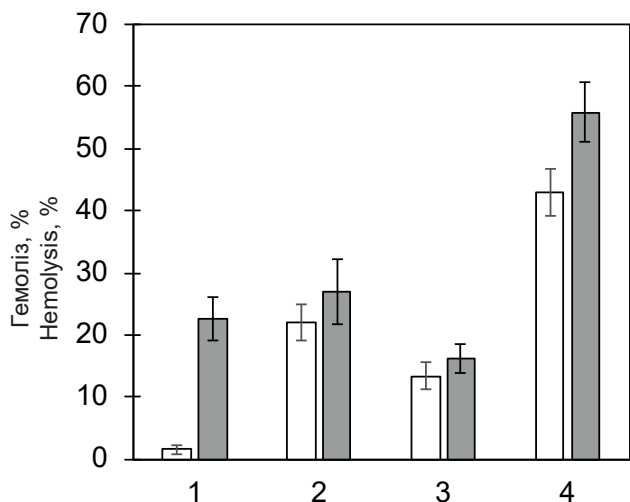


Рис. 1. Пошкодження еритроцитів собак у циклі заморожування-відігрівання під захистом різних криопротекторів: 1 – 15% ПЕГ-1500; 2 – 10% ДМСО; 3 – 10% ДМСО; 4 – 12,5% ГЕК. Кріоконсерванти 1, 2, 4 містять 150 мМ NaCl, 10 мМ фосфатного буфера; 3 – 200 мМ сахарози, 50 мМ NaCl, 10 мМ фосфатного буфера; □ – гемоліз після розморожування, ■ – гемоліз після видалення криопротектора; $p < 0,05$.

Fig. 1. Injury of canine erythrocytes in freeze-warming cycle under protection of different CPAs: 1 – 15% PEG-1500; 2 – 10% DMSO; 3 – 10% DMSO; 4 – 12.5% HES. Cryopreservatives 1, 2, 4 contain 150 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer; 3 – 200 mM sucrose, 50 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer; □ – hemolysis after warming, ■ – hemolysis after CPA removal; $p < 0.05$.

case the cells swell and can maximize 1.8–2 times their volume. Therefore, impermeable sucrose was added to the medium to eliminate or reduce edema.

It was found that the involvement of sucrose into the medium increases the preservation of cells after thawing and especially after the CPA removal from the cells (Fig. 1). When using an isotonic sucrose-salt medium in a DMSO solution, the total hemolysis (after thawing and removal of the CPA from the cells) was reduced by 10%. It can be concluded that reducing the salt concentration and adding sucrose to cryopreservatives with 10% DMSO can save more cells. These data are consistent with those of D.I. Aleksandrova *et al.* [1], which evidence that an increase in the concentration of salts in extracellular environment leads to a decrease in mechanical stability of erythrocytes, damaging them during freeze-warming. However, sucrose in the medium acts as an osmotic buffer, which reduces the osmotic shock after thawing. Therefore, besides reducing the salt concentration, the addition of sucrose to the medium leads to a decrease in the degree of cell injury, which is observed especially after washing the cells from the CPAs.

The mechanical stability of cells after incubation with CPAs in all research variants does not differ significantly from that for the control cells (Fig. 2).

рожування, так і після видалення криопротектора. Під час використання сахарозно-сольового середовища рівень гемолізу після заморожування-відігрівання ще більше знижувався. При цьому зниження концентрації солі й підвищення концентрації сахарози в розчині криопротекторів сприятливо позначалося на збереженні клітин у процесі заморожування-відігрівання.

Таким чином, застосування комбінації проникного ДМСО і непроникного ПЕГ-1500 під час швидкого заморожування виявилось не ефективним для захисту еритроцитів собак від несприятливих факторів низькотемпературного консервування. Це підтверджується даними у роботі Н. Г. Землянських та співавт. [8], у якій показано, що під час використання ПЕГ-1500 для кріоконсервування еритроцитів людини порушується асиметрія розподілу фосфатидилсерину в мембрані, що вказує на її субле-

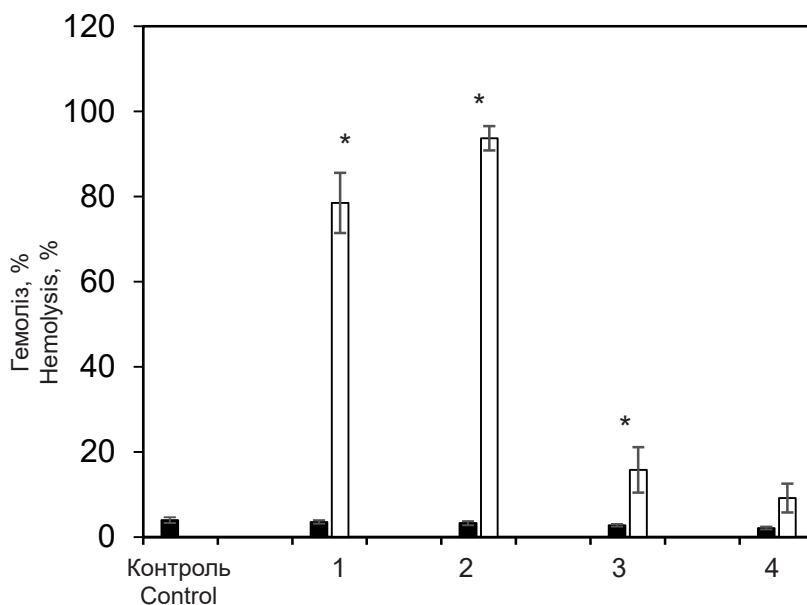


Рис. 2. Пошкодження еритроцитів при механічному стресі протягом 30 хв: ■ – додавання криопротектора; □ – кріоконсервовані еритроцити. * – підвищення значуще щодо контрольного розчину (150 мМ NaCl, pH 7,4); 1 – ПЕГ-1500, 2 – ГЕК, 3 – ДМСО (сольове середовище), 4 – ДМСО (сахарозно-сольове середовище); $p < 0,05$.

Fig. 2. Injury to erythrocytes under mechanical stress for 30 minutes: ■ – with CPA; □ – cryopreserved erythrocytes. * – significant increase relative to the control solution (150 mM NaCl, pH 7.4); 1 – PEG-1500, 2 – HES, 3 – DMSO (saline medium), 4 – DMSO (sucrose-saline medium); $p < 0.05$.



тальні пошкодження. Отже, застосування комбінованих розчинів із використанням ПЕГ-1500 не захищає клітини від ушкоджень еритроцитарних мембран і його не слід використовувати в протоколах кріоконсервування еритроцитів собак.

На рис. 1 у порівнянні показано ступінь пошкодження еритроцитів собак після заморожування-відігрівання під захистом непрониких ПЕГ-1500, ГЕК і проникного ДМСО кріопротекторів. Відразу після розморожування кращі кріозахисні властивості показав непроникий кріопротектор ПЕГ-1500, однак після видалення кріопротектора фізіологічним розчином NaCl рівень гемолізу різко збільшився. Відомо [2], що ПЕГ-1500 не потрібно видаляти перед трансфузією, але клітини потрапляють в ізотонічне середовище в руслі крові, у якому і можуть бути сильно пошкоджені. Ймовірно, присутність ПЕГ-1500 маскує наявність прихованих пошкоджень.

Проникний ДМСО дозволяє зберегти еритроцити собак на досить високому рівні під час заморожування-відігрівання [5]. Тому ми використовували цей кріопротектор у 10%-й концентрації, а з метою оптимізації умов заморожування в середовище заморожування додавали різну кількість солі й сахарози. Після заморожування-відігрівання в ізотонічному середовищі до насичених кріопротектором клітин спрямовується вода [6]. За цих умов клітини набрякають і можуть максимально збільшити свій об'єм в 1,8–2 рази. У зв'язку з цим для виключення або зменшення рівня набрякання до середовища вводили непронику сахарозу.

Було встановлено, що включення до середовища сахарози підвищує збереженість клітин після розморожування і особливо після видалення кріопротектора з них (рис. 1). Під час використання ізотонічного сахарозно-сольового середовища в розчині ДМСО загальний гемоліз (після розморожування і видалення кріопротектора з клітин) знижувався на 10%. Можна зробити висновок, що зниження концентрації солі й додавання сахарози до кріоконсервантів із 10%-м ДМСО дозволяють зберегти більшу кількість клітин. Ці дані узгоджуються з результатами Д. І. Александрова та співавт. [1], згідно з якими зростання концентрації солей у позаклітинному середовищі призводить до зниження механічної ста-

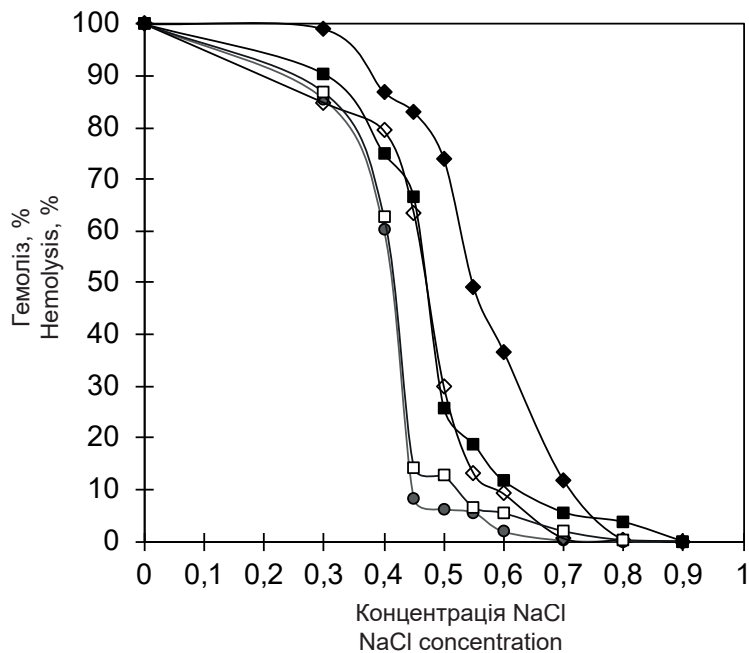


Рис. 3. Криві осмотичної крихкості еритроцитів собак: ● – контрольні клітини; ◊ – клітини після експонування з 10% ДМСО, який містить 150 мМ NaCl; ◆ – клітини після кріоконсервування під захистом 10%-го ДМСО, який містить 150 мМ NaCl; ◻ – клітини після експонування з 10%-м ДМСО, що містить 200 мМ сахарози та 50 мМ NaCl; ■ – клітини після кріоконсервування під захистом 10%-го ДМСО, що містить 200 мМ сахарози та 50 мМ NaCl.

Fig. 3. Curves of osmotic fragility of canine erythrocytes: ● – control cells; ◊ – cells after exposure to 10% DMSO, which contains 150 mm NaCl; ◆ – cells after cryopreservation under protection of 10% DMSO, which contains 150 mm NaCl; ◻ – cells after exposure to 10% DMSO containing 200 mM sucrose and 50 mM NaCl; ■ – cells after cryopreservation under protection of 10% DMSO containing 200 mM sucrose and 50 mM NaCl.

However, after freeze-warming the degree of hemolytic damage to cells increased sharply during their cryopreservation under protection of impermeable CPAs (PEG-1500 and HEC). A sharp decrease in mechanical stability of these cells may indicate significant injury to erythrocytes after cryopreservation. Thus, the use of erythrocyte suspension after cryopreservation under the protection of impermeable CPAs is impossible. The transfer of such cells into the bloodstream of dogs will cause intravascular hemolysis, which can have negative consequences for animal health.

The results of studying the mechanical stability of the cells cryopreserved with permeable CPA DMSO, showed a high level of cell stability after thawing (Fig. 2). It is possible [44] that the CPA based on sucrose-saline medium does not cause serious changes in the membrane properties if compared to the saline, that allows their use in veterinary practice.

Because impermeable CPAs in the studied conditions do not provide a sufficient cell protection, at the next stage of the investigation we used only

більності еритроцитів, що пошкоджує їх під час заморожування-відігрівання. Однак сахароза в середовищі виступає у якості осмотичного буфера, який зменшує осмотичний шок після відтавання. Тому, крім зниження концентрації солі, додавання в середовище сахарози приводить до зниження ступеня пошкодження клітин, що спостерігається особливо після відмивання клітин від кріопротектора.

Механічна стійкість клітин після інкубації з кріопротекторами в усіх досліджувальних варіантах значуще не відрізняється від стійкості контрольних клітин (рис. 2). Однак після заморожування-відігрівання ступінь гемолітичних пошкоджень клітин різко збільшувалася під час їх кріоконсервування під захистом непроникних кріопротекторів (ПЕГ-1500 та ГЕК). Різке зниження механічної стійкості клітин може свідчити про значні їх пошкодження після кріоконсервування. Таким чином, використання суспензії еритроцитів після кріоконсервування під захистом непроникних кріопротекторів є неможливим. Перенесення таких клітин у русло крові собак зумовить внутрішньосудинний гемоліз, що може мати негативні наслідки для здоров'я тварин.

Результати дослідження механічної стійкості клітин, кріоконсервованих під захистом проникного кріопротектора ДМСО, показали високий рівень їх стійкості після розморожування (рис. 2).

Можливо [6], що кріопротектор на основі сахарозно-сольового середовища не викликає серйозних змін властивостей мембран порівняно з сольовим середовищем, що дозволяє використовувати його у ветеринарній практиці.

Оскільки непроникні кріопротектори в досліджуваних умовах не забезпечують достатній рівень захисту клітин, то на наступному етапі дослідження застосовували тільки ДМСО, порівнюючи склад середовищ (сольове і сахарозно-сольове). Нами було проведено тест на осмотичну крихкість еритроцитів, який є інтегральним показником, що відображає механо-еластичні властивості мембрани.

Криві осмотичної крихкості клітин, кріоконсервованих під захистом ДМСО, представлені на рис. 3. Слід зазначити, що після інкубації з ДМСО не відбувалося істотних змін осмотичної крихкості еритроцитів в обох випадках: цей кріопротектор практично не впливає на

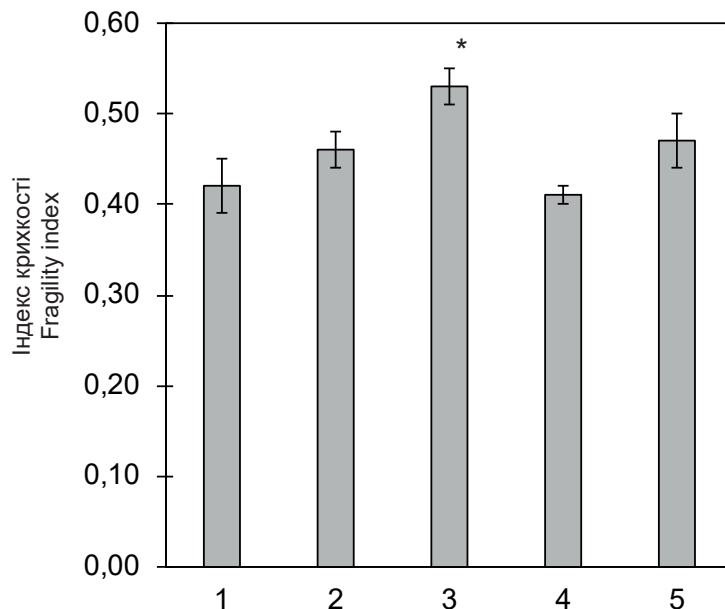


Рис. 4. Індекс осмотичної крихкості еритроцитів собак: 1 – контрольні клітини; 2 – клітини після експонування з 10% ДМСО, який містить 150 мМ NaCl; 3 – клітини після кріоконсервування під захистом 10%-го ДМСО, який містить 150 мМ NaCl; 4 – клітини після експонування з 10%-м ДМСО, що містить 200 мМ сахарози та 50 мМ NaCl; 5 – клітини після кріоконсервування під захистом 10% ДМСО, що містить 200 мМ сахарози та 50 мМ NaCl. * – підвищення індексу крихкості значуще щодо контролю, $p < 0,05$.

Fig. 4. Index of canine erythrocytes' osmotic fragility: 1 – control cells; 2 – cells after exposure to 10% DMSO containing 150 mM NaCl; 3 – cells after cryopreservation under protection of 10% DMSO, which contains 150 mM NaCl; 4 – cells after exposure to 10% DMSO containing 200 mM sucrose and 50 mM NaCl; 5 – cells after cryopreservation under protection of 10% DMSO containing 200 mM sucrose and 50 mM NaCl. * – increase in fragility index is significant relative to the control, $p < 0.05$.

DMSO, comparing the composition of the media (salt and sucrose-salt). We performed a test for osmotic fragility of erythrocytes, which was an integral index, reflecting the membrane mechano-elastic properties.

The curves of osmotic fragility for the cells cryopreserved with DMSO are presented in Figure 3. It should be noted that after incubation with DMSO there were no significant changes in osmotic fragility of erythrocytes in both cases: this CPA slightly affected the mechano-elastic properties of erythrocyte membrane, but after freeze-warming they deteriorated significantly when just saline was used. This is manifested in the shift of the lysis curve of erythrocytes in hypotonic solutions to an increase in NaCl concentration. After the CPA was used jointly with sucrose-saline medium, as well as after freeze-warming with this cryopreservative, no response to osmotic changes was observed.



механо-еластичні властивості мембрани еритроцитів, однак після використання тільки сольового середовища та заморожування-відігрівання вони істотно погіршуються. Це проявляється у зміщенні кривої лізису еритроцитів у гіпотонічних розчинах до збільшення концентрації NaCl. Після використання кріопротектора в комбінації з сахарозно-сольовим середовищем, а також після заморожування-відігрівання під захистом цього кріоконсерванта реакція на осмотичні зміни були відсутні.

З кривих осмотичної крихкості було визначено індекс крихкості (рис. 4). Після інкубування еритроцитів у кріопротекторних розчинах не спостерігалось значущих відмінностей від контрольної групи. Але після кріоконсервування еритроцитів під захистом ДМСО на основі сольового розчину відбувається збільшення даного показника (тобто клітини стають більш крихкими) на відміну від клітин, кріоконсервованих із ДМСО на основі сахарозно-сольового розчину.

Додавання непроникної сахарози до проникного кріопротектора ДМСО ймовірно покращує регуляцію осмотичних і метаболічних процесів у клітинах, сприяє ефективному захисту і репарації клітинної мембрани еритроцитів у процесі заморожування-відігрівання.

Висновки

1. Використання комбінованих розчинів кріопротекторів на основі ПЕГ-1500 (15%) і ДМСО (2,5–10%) у сольовому середовищі є недостатньо ефективним для кріоконсервування еритроцитів собак.

2. Зниження концентрації солі й додавання до середовища кріоконсервування непроникної до клітин сахарози сприяє підвищенню збереженості еритроцитів після кріоконсервування.

3. Найбільш ефективним кріоконсервантом для еритроцитів собак виявився 10%-й ДМСО на основі сахарозно-сольового середовища.

4. Висока збереженість, механічна і осмотична стійкість еритроцитів, кріоконсервованих у 10%-му ДМСО на основі сахарозно-сольового середовища свідчать про можливість заморожування, довгострокового зберігання та створення запасів еритроцитів собак різних груп крові для застосування в трансфузіології.

Література

1. Александрова ДИ, Землянский НГ. Влияние ионного состава кріопротекторной среды и кріоконсервирования на

The fragility index was determined from the osmotic fragility curves (Fig. 4). After incubation of erythrocytes in cryoprotective solutions, no significant differences if compared with the control group were found. But after cryopreservation of erythrocytes with DMSO based on saline, there is an increase in this index (*i. e.* cells become more fragile) in contrast to the cells cryopreserved with DMSO based on sucrose-saline solution.

The supplementing of impermeable sucrose to permeable CPA DMSO probably improves the regulation of osmotic and metabolic processes in cells, promotes effective protection and repair of the erythrocyte membrane in freeze-warming.

Conclusions

1. The use of combined solutions of CPAs based on PEG-1500 (15%) and DMSO (2.5-10%) in saline was not effective enough for cryopreservation of canine erythrocytes.

2. Reducing the salt concentration and adding the sucrose impermeable to cells into the cryopreservation medium contributed to preservation of erythrocytes after cryopreservation.

3. The most effective cryopreservative for canine erythrocytes occurred to be 10% DMSO based on sucrose-saline medium.

4. High preservation rate, mechanical and osmotic stability of the erythrocytes, cryopreserved with 10% DMSO on the basis of sucrose-salt medium indicated the possibility of freezing, long-term storage and accumulation of canine erythrocytes of different blood groups for application in transfusion.

References

1. Aleksandrova DI, Zemlianskykh NG. Impact of ionic composition of cryoprotective medium and cryopreservation on human erythrocyte sensitivity to mechanical stress. *Probl Cryobiol Cryomed* 2019; 29(4): 317–31.
2. Babychuk LA, Zemlianskykh NG. Optimization and advantages of washing-out method of erythrocyte cryopreservation with PEO-1500. *Problems of Cryobiology*. 2001; (1): 35–41.
3. Barfield D, Adamantos S. Feline blood transfusions: A pinker shade of pale. *J Feline Med Surg*. 2011; 13 (1): 11–23.
4. Bogdanchikova OA, Gurina TM, Kompaniets AM. Blood platelet freezing under cryoprotective media with different combinations of cryoprotectants. *Problems of Cryobiology*. 2008; 18 (1): 109–13.



- чувствительность эритроцитов человека к механическому стрессу. Проблемы кріобіології і кріомедицини. 2019; 29(4): 317–31.
2. Бабийчук ЛА, Землянских НГ. Оптимизация и преимущества безотмывочного метода криоконсервирования эритроцитов с ПЭО-1500. Проблемы кріобіології. 2001; (1): 35–41.
 3. Богданчикова ОА, Гурина ТМ, Компаниец АМ. Замораживание тромбоцитов в криозащитных средах, содержащих различные комбинации криопротекторов. Проблемы кріобіології. 2008; 18 (1): 109–13.
 4. Денисова ОН, Жегунов ГФ, Бабийчук ЛА. Криоконсервирование эритроцитов животных под защитой диметилсульфоксида, полиэтиленгликоля и глицерина. Проблемы кріобіології. 2005; 15 (2): 196–201.
 5. Денисова ОН, Жегунов ГФ, Землянских НГ. Стійкість еритроцитів тварин проти впливу низьких температур. Науковий вісник Національного аграрного університету. 2008; 126: 67–5.
 6. Жегунов ГФ, Нардид ОА, редакторы. Основы кріобіології и кріомедицини. Харьков: 2019. 616 с.
 7. Землянских НГ. Влияние криопротекторных веществ на механическую устойчивость и геометрические параметры эритроцитов человека. Биофизика. 2018; 63 (1): 94–105.
 8. Землянских НГ, Бабийчук ЛА. Влияние криоконсервирования в присутствии криопротектора ПЭГ-1500 на поверхностные характеристики эритроцитов. Проблемы кріобіології и кріомедицини. 2015; 25 (2): 104–13.
 9. Костяев АА, Мартусевич АК, Андреев АА. Токсичность криопротекторов и криоконсервантов на их основе для компонентов крови и костного мозга. Научное обозрение. Медицинские науки. 2016; (6): 54–74.
 10. Междов СХ, Моисеев ВА. Влияние сочетания высокомолекулярных криопротекторов с 1,2-пропандиолом на сохранность эритроцитов при криоконсервировании. Проблемы кріобіології. 1995; (3): 46–8.
 11. Пахомова ЮС, Чеканова ВВ, Компаниец АМ. Криозащитные свойства растворов на основе непроникающего ОЭГⁿ⁼²⁵ в комбинации с проникающими криопротекторами при замораживании эритроцитов человека. Проблемы кріобіології и кріомедицини. 2013; 23 (1): 26–39.
 12. Улизко ПЮ, Боброва ЕН, Жегунов ГФ, Зинченко АВ. Влияние смесей криопротекторов на сохранность криоконсервированных эритроцитов млекопитающих. Вісник проблем біології і медицини. 2011; (3, Part 3): 26–9.
 13. Barfield D, Adamantos S. Feline blood transfusions: A pinker shade of pale. J Feline Med Surg. 2011; 13 (1): 11–23.
 14. Contreras TJ, Lindberg JR, Lowrie GB, et al. Liquid and freeze-preservation of dog red blood cells, Transfusion. 1979; 19 (3): 279–92.
 15. Cotter SM. Advances in veterinary science and comparative medicine: comparative transfusion medicine. San Diego: Academic Press; 1991. Vol. 36.
 16. DeLuca LA, Glass SG, Johnson RE, Burger M. Description and evaluation of a canine volunteer blood donor program. J Appl Anim Welf Sci. 2006; 9 (2): 129–41.
 17. Feinman HM, Ben M, Lein R. Toxicology of DMSO in primate. Pharmacologist. 1964; 6 (1): 188–93.
 18. Feldman BF, Kristensen AT. Modern veterinary blood banking practices and their applications in companion animal practice. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1995; 25 (6): 1231–43.
 19. Gao D, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. ILAR J. 2000; 41(4):187–96.
 20. González-Guerrero C, Montoro-Ronsano JB. Physiopathology and treatment of critical bleeding: a literature review. Farm Hosp. 2015; 39 (6): 382–98.
 21. Graham JE, Meola DM, Kini NR, Hoffman AM. Comparison of the effects of glycerol, dimethyl sulfoxide, and hydroxyethyl starch solutions for cryopreservation of avian red blood cells. Am J Vet Res. 2015; 76 (6): 487–93.
 22. Kristensen AT, Feldman BF. Blood banking and transfusion medicine. In: Ettinger SJ, Feldman EC, editors. Textbook of veterinary internal medicine. Diseases of the dog and cat. Philadelphia: W. B. Saunders; 1995. p. 347–60.
 23. Kummerow D, Hamann J, Browning JA, et al. Variations of intracellular pH in human erythrocytes via K⁺(Na⁺)/H⁺ exchange under low ionic strength conditions. J Membrane Biol. 2000; 176(3): 207–16.
 24. Langer R, Albrecht R, Hempel K, et al. Characterization of 24-hour survival rate and duration of survival of hydroxyethyl starch cryopreserved erythrocytes after autologous transfusion in the dog. Infusionsther Transfusionsmed. 1994; 21 (6): 393–400.
 25. Lovelock F, Bishop MW. Prevention of freezing damage to living cells by DMSO. Nature, 1959; 183 (4666): 1394–5.



22. Heesch H, Day JG, Yamagishi T, Kawai H, et al. Cryopreservation of the model alga *Ectocarpus* (Phaeophyceae). *CryoLetters*. 2012; 33 (5): 327–36.
23. Huggins CE. Preservation of hemolysis of large volumes of red blood cells slowly frozen and thawed in the presence of dimethylsulphoxide. *Transfusion*. 1963; 3 (4): 557–8.
24. Jain NC. Osmotic fragility of erythrocytes of dogs and cats in health and in certain hematologic disorders. *Cornell Vet*. 1973; 63 (3): 411–23.
25. Ishiguro H, Rubinsky B. Mechanical interactions between ice crystals and red blood cells during directional solidification. *Cryobiology*. 1994; 31 (5): 483–500.
26. Kim H, Itamoto K, Une S, et al. Application of phosphoenolpyruvate into canine red blood cell cryopreservation with hydroxyethyl starch. *CryoLetters*. 2005; 26 (1): 1–6.
27. Kim H, Tanaka S, Une S, et al. A comparative study of the effects of glycerol and hydroxyethyl starch in canine red blood cell cryopreservation. *J Vet Med Sci*. 2004; 66 (12): 1543–7.
28. Kristensen AT, Feldman BF. Blood banking and transfusion medicine. In: Ettinger SJ, Feldman EC, editors. *Textbook of veterinary internal medicine. Diseases of the dog and cat*. Philadelphia: W. B. Saunders; 1995. p. 347–60.
29. Kummerow D, Hamann J, Browning JA, et al. Variations of intracellular pH in human erythrocytes via $K^+(Na^+)/H^+$ exchange under low ionic strength conditions. *J Membrane Biol*. 2000; 176(3): 207–16.
30. Langer R, Albrecht R, Hempel K, et al. Characterization of 24-hour survival rate and duration of survival of hydroxyethyl starch cryopreserved erythrocytes after autologous transfusion in the dog. *Infusionsther Transfusionsmed*. 1994; 21 (6): 393–400.
31. Lovelock F, Bishop MW. Prevention of freezing damage to living cells by DMSO. *Nature*, 1959; 183 (4666): 1394–5.
32. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol*. 1963; 47: 347–69.
33. McWilliams RB, Gibbons W, Leibo S. Osmotic and physiological responses of mouse zygotes and human oocytes to mono- and disaccharides. *Hum Reprod*. 1995; 10: 1163–71.
34. Moersdorf D, Egee S, Hahn C, et al. Transmembrane potential of red blood cells under low ionic strength conditions. *Cell Physiol Biochem*. 2013; 31(6): 875–82.
35. Naaldijk Y, Staude M, Fedorova V, Stolzing A. Effect of different freezing rates during cryopreservation of rat mesenchymal stem cells using combinations of hydroxyethyl starch and dimethylsulfoxide. *BMC Biotechnol* [Internet]. 2012 Aug 13 [cited 2020 Jan 20]. Available from: <https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6750-12-49>
36. Penninckx F, Poelmans S, Kerremans R, De Loecker W. Erythrocyte swelling after rapid dilution of cryoprotectants and its prevention. *Cryobiology*. 1984; 21(1): 25–32.
37. Petrenko YA, Jones DR, Petrenko AY. Cryopreservation of human fetal liver hematopoietic stem/progenitor cells using sucrose as an additive to the cryoprotective medium. *Cryobiology*. 2008; 57 (3): 195–200.
38. Price GS, Armstrong PJ, McLeod DA, et al. Evaluation of citrate-phosphate-dextrose-adenine as a storage medium for packed canine erythrocytes. *J Vet Intern Med*. 1988; 2(3): 126–32.
39. Quan GB, Han Y, Liu MX. 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; 59 (3): 258–67.
40. Rosenbaum EE. Klinische Erfahrungen mit der Anwendung von DMSO. In: von Laudahn G, Gertich K, editors. *DMSO-Symposium. 2 Internationales Symposium. 8–9 November 1966, Vienna, Austria*. Berlin: Saladruck; 1966; 47–8.
41. Rozanski E, de Laforcade AM. Transfusion medicine in veterinary emergency and critical care medicine. *Clin Tech Small Anim Pract*. 2004; 19 (2): 83–7.
42. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol*. 1963; 47: 347–69.
43. McWilliams RB, Gibbons W, Leibo S. Osmotic and physiological responses of mouse zygotes and human oocytes to mono- and disaccharides. *Hum Reprod*. 1995; 10: 1163–71.
44. Mezhdidov SKh, Moiseyev VA. Effect of combined treatment by highly molecular cryoprotectants and 1,2-propanediol on survival of red blood cells during cryopreservation. *Problems of Cryobiology*. 1995; (3): 45–7.
45. Moersdorf D, Egee S, Hahn C, et al. Transmembrane potential of red blood cells under low ionic strength conditions. *Cell Physiol Biochem*. 2013; 31(6): 875–82.
46. Naaldijk Y, Staude M, Fedorova V, Stolzing A. Effect of different freezing rates during cryopreservation of rat mesenchymal stem cells using combinations of hydroxyethyl starch and dimethylsulfoxide. *BMC Biotechnol* [Internet]. 2012 Aug 13 [cited 2020 Jan 20]. Available from: <https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6750-12-49>
47. Pakhomova YS, Chekanova VV, Kompaniets AM. Cryoprotective properties of solutions based on non-penetrative OEG^{n = 25} combined with penetrating cryoprotectants during freezing of human erythrocytes. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2013; 23 (1): 26–39.
48. Penninckx F, Poelmans S, Kerremans R, De Loecker W. Erythrocyte swelling after rapid dilution of cryoprotectants and its prevention. *Cryobiology*. 1984; 21(1): 25–32.
49. Petrenko YA, Jones DR, Petrenko AY. Cryopreservation of human fetal liver hematopoietic stem/progenitor cells using sucrose as an additive to the cryoprotective medium. *Cryobiology*. 2008; 57 (3): 195–200.
50. Price GS, Armstrong PJ, McLeod DA, et al. Evaluation of citrate-phosphate-dextrose-adenine as a storage medium for packed canine erythrocytes. *J Vet Intern Med*. 1988; 2(3): 126–32.
51. Quan GB, Han Y, Liu MX. 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; 59 (3): 258–67.
52. Rosenbaum EE. Klinische Erfahrungen mit der Anwendung von DMSO. In: von Laudahn G, Gertich K, editors. *DMSO-Symposium. 2 Internationales Symposium. 8–9 November 1966, Vienna, Austria*. Berlin: Saladruck; 1966; 47–8.
53. Rozanski E, de Laforcade AM. Transfusion medicine in veterinary emergency and critical care medicine. *Clin Tech Small Anim Pract*. 2004; 19 (2): 83–7.
54. Saragusty J, Gacitua H, Rozenboim I, Arav A. Do physical forces contribute to cryodamage? *Biotechnol Bioeng*. 2009; 104 (4): 719–28.
55. Sputtek A, Langer R, Schmid H, et al. Cryopreservation of erythrocytes with hydroxyethyl starch. *In vitro* results leading to an autologous retransfusion model in the dog. *Beitr Infusionsther*. 1992; 30: 292–6.
56. Ulizko PY, Zhegunov GF, Bobrova OM, Zinchenko OV. [Influence of mixture of cryoprotective agents on integrity of cryopreserved mammalian erythrocytes]. *Bulletin of Problems in Biology and Medicine*. 2011; (3, Part 3): 26–9. Russian.
57. Vácha R, Berkowitz ML, Jungwirth P. Molecular model of a cell plasma membrane with an asymmetric multicomponent composition: water permeation and ion effects. *Biophys J*. 2009; 96(11): 4493–501.
58. Zemlianskykh NG. [Effects of cryoprotective substances on mechanical stability and geometrical parameters of human erythrocytes]. *Biofizika*. 2018; 63 (1): 94–105. Russian.
59. Zemlianskykh NG, Babychuk LA. Cryopreservation in presence of PEG-1500 affects erythrocyte surface characteristics. *Probl Cryobiol. Cryomed*. 2015; 25(2): 104–13.



42. Saragusty J, Gacitua H, Rozenboim I, Arav A. Do physical forces contribute to cryodamage? *Biotechnol Bioeng.* 2009; 104 (4): 719–28.
43. Sutteck A, Langer R, Schmid H, et al. Cryopreservation of erythrocytes with hydroxyethyl starch. In vitro results leading to an autologous retransfusion model in the dog. *Beitr Infusionsther.* 1992; 30: 292–6.
44. Vácha R, Berkowitz ML, Jungwirth P. Molecular model of a cell plasma membrane with an asymmetric multicomponent composition: water permeation and ion effects. *Biophys J.* 2009; 96(11): 4493–501.
44. Zhegunov GF, Nardid OA, editors. [Basics of cryobiology and cryomedicine.] Kharkiv: Brovin AB; 2019. 616p. Russian.

