

УДК 636.7.09:616.993.192.6–085:615.38

О.М. Денисова*, Г.Ф. Жегунов, Т.І. Якименко,
Н.І. Гладка, В.О. Приходченко, О.М. Бобрицька

Гематологічний профіль собак під час комплексного лікування бабезіозу з використанням трансфузії криоконсервованих еритроцитів

UDC 636.7.09:616.993.192.6–085:615.38

О.М. Denysova*, G.F. Zhegunov, T.I. Yakimenko, N.I. Hladka,
V.O. Prykhodchenko, O.M. Bobrytska

Blood Characteristics in Dogs During Treatment of Babesiosis Using Transfusion of Cryopreserved Erythrocytes

Реферат: Бабезіоз є одним із розповсюджених у всьому світі протозойних захворювань собак, яке за відсутності необхідної ветеринарної допомоги часто призводить до загибелі тварини. У роботі оцінювали зміни гематологічних показників собак під час комплексного лікування бабезіозу та трансфузії криоконсервованих еритроцитів. Еритроцити заморожували із застосуванням 20%-го ДМСО шляхом занурення у рідкий азот. Показано, що трансфузія криоконсервованих еритроцитів разом із проти-паразитарною хімотерапією сприяє швидкому відновленню гематологічних показників тварин (рівня гемоглобіну, гематокриту та кількості еритроцитів), а також покращує їх самопочуття, сприяє більш швидкому одужанню. Криоконсервовані з ДМСО еритроцити можуть бути рекомендовані для довготривалого зберігання крові у криобанках.

Ключові слова: бабезіоз, еритроцити собак, трансфузія, криоконсервування, кріопротектор.

Abstract: Babesiosis is one of the most common protozoan diseases in dogs, which in the absence of the necessary veterinary care often leads to the animal death. The changes of hematological parameters in dogs during complex treatment of babesiosis and transfusion of cryopreserved erythrocytes were evaluated in the research. Erythrocytes were frozen using 20% DMSO by immersion into liquid nitrogen. Transfusion of cryopreserved erythrocytes together with antiparasitic chemotherapy has been shown to promote rapid recovery of hematological parameters of animal blood (hemoglobin, hematocrit and erythrocyte counts), as well as improves their well-being, promotes faster recovery. Cryopreserved with DMSO erythrocytes can be recommended for long-term storage of blood at cryobanks.

Key words: babesiosis, canine erythrocytes, transfusion, cryopreservation, cryoprotectant.

Переливання крові є ефективним і основним способом лікування важких форм бабезіозу у собак – паразитарного захворювання крові, викликаного найпростішими *Babesia canis* через укуси кліщів. Інкубаційний період хвороби варіюється від трьох діб до трьох тижнів і залежить від імунітету тварини і кількості заражених кліщів, які паразитували на собаці. Бабезіоз характеризується великою втратою еритроцитів (від $5,5 - 8 \times 10^{12}/л$ до $2,65 - 2,8 \times 10^{12}/л$), у результаті чого розвивається анемія. Вважається, що зниження гематокриту нижче 15% є показником для переливання крові, особливо, якщо у собак спостерігається розвиток дихальної недостатності.

Для трансфузій у ветеринарних закладах зазвичай використовують донорську кров, але в клініках необхідні запаси крові собак не попов-

Blood transfusion is an effective and primary way to treat severe forms of canine babesiosis, which is a blood disease caused by the parasites *Babesia canis* transmitted via tick bites. The disease incubation period varies from three days to three weeks and depends on the animal immunity and number of infected ticks that have parasitized the dog. Babesiosis is characterized by a large loss of erythrocytes (from $5.5 - 8 \times 10^{12}/l$ to $2.65 - 2.8 \times 10^{12}/l$), resulting in the anemia development. Decrease in hematocrit below 15% is believed to be indicator for blood transfusion, especially if dogs develop respiratory failure.

Donor blood is usually used for transfusions in veterinary clinics, but the latter required the canine blood supply which is not replenished, due to the lack of special donors and the difficulty of blood collection by phenotypic characteristics

Державний біотехнологічний університет, Інститут ветеринарної медицини та тваринництва

State Biotechnological University, Institute of Veterinary Medicine and Animal Husbandry

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Академічна, 1, смт. Мала Данилівка, Харківська обл., Україна 62341;
тел.: (+38 057) 635-74-73
електронна пошта: denysova78@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

1, Akademichna str., village Mala Danylivka, Kharkiv region, Ukraine 62341;
tel.: +380 57 635 7473
e-mail: denysova78@gmail.com

Надійшла 12.06.2020

Прийнята до друку 19.10.2021

Received 12, June, 2020

Accepted 19, October, 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.

нюються, що пояснюється відсутністю спеціальних донорів і складністю відбору крові за фенотиповими ознаками [11, 12]. В екстрених випадках кров беруть від собак, які знаходяться у приютах.

Кров для переливання зазвичай збирається і зберігається у розчинах антикоагулянтів, основними з яких є цитрат-декстрозний (ACD) і цитрат-фосфат-декстрозно-аденіловий (CPDA-1). Кров, заготовлена з такими антикоагулянтами-консервантами, може зберігатися до 20 діб [20, 25] у гіпотермічних умовах при 4°C. Однак під час такого зберігання відбуваються біохімічні зміни, які погіршують метаболізм, що призводить до порушення форми та об'єму еритроцитів з подальшим зниженням їх фізіологічних функцій. Для довготривалого зберігання еритроцитів (протягом кількох років) ідеальним методом є заморожування суспензій клітин за температур -80...-196°C. Слід зазначити, що на даний час не розроблено ефективних способів кріоконсервування і довготривалого зберігання еритроцитів собак.

Для збереження клітин під час заморожування-відігріву обов'язково використовують кріопротектори. Показано, що кріоконсервування еритроцитів собак за температури до -80°C з гліцеролом у достатньо високих концентраціях (40%) забезпечує задовільний (до 75%) захист клітин від пошкоджувальної дії низькотемпературних факторів [9, 10]. Однак за такої високої концентрації кріопротектора обов'язковим є його видалення перед трансфузією для запобігання осмотичному лізису клітин у процесі трансфузії. Цю процедуру доцільно застосовувати в експерименті, але вона досить складна і дорога.

Крім того, для заморожування еритроцитів собак використовують непроникні в клітину кріопротектори – гідроксиетильований крохмаль (ГЕК) м. м. 200 [15, 19] і поліетиленгліколь м. м. 1500 (ПЕГ-1500) [1]. Під захистом ГЕК та ПЕГ-1500 після розморожування зберігається 80–90% клітин. Однак вони після розморожування і перенесення у фізіологічні умови є нестійкими, що під час трансфузії може призвести до їх внутрішньосудинного гемолізу.

Нами раніше показано, що достатньо високу збереженість (75–80%) еритроцитів собак до дії низькотемпературних факторів під час кріоконсервування можна досягти за рахунок використання 20%-го диметилсульфоксиду (ДМСО) [1]. При цьому більшість еритроцитів після розморожування та відмивання від кріопротектора і перенесення у фізіологічні умови добре зберігаються [2]. Однак кріоконсервовані за даною

[3, 4]. In emergencies, blood is taken from dogs in shelters.

Blood for transfusion is usually collected and stored in anticoagulant solutions, the main of which are citrate-dextrose (ACD) and citrate-phosphate-dextrose-adenyl (CPDA-1). Blood harvested with such anticoagulants-preservatives can be stored for up to 20 days [16, 22] under hypothermic conditions at 4°C. However, during such storage, biochemical changes impairing metabolism take place and lead to disruption of the shape and volume of erythrocytes, followed by a decrease in their physiological functions. For long-term storage of erythrocytes (for several years), the cell suspensions freezing at temperatures of -80...-196°C is the ideal method. It should be noted that currently no more effective methods of cryopreservation and long-term storage of canine erythrocytes have been developed.

Usage of cryoprotectants is mandatory to preserve the cells during freeze-thaw. Cryopreservation of canine erythrocytes at temperatures down to -80°C with glycerol in sufficiently high concentrations (40%) is shown to provide satisfactory (up to 75%) protection of cells against the damaging effects of low-temperature factors [1, 2]. However, at such a high concentration of cryoprotectant, it is obligatory to remove it before transfusion to prevent osmotic lysis of cells during transfusion. This procedure should be used in an experiment, but it is quite complicated and expensive.

In addition, to freeze the canine erythrocytes using impermeable to a cell cryoprotectants, namely hydroxyethylated starch (HEC) m. m. 200 [9, 15] and polyethylene glycol m. m. 1500 (PEG-1500) [5] are applied. Under the HEC and PEG-1500 protection 80–90% of cells have been preserved after thawing. However, they are unstable after thawing and transfer to physiological conditions, which during transfusions can lead to their intravascular hemolysis.

We have previously shown that a sufficiently high preservation (75–80%) of canine erythrocytes regarding of the influence of low-temperature factors during cryopreservation can be achieved via using the 20% dimethyl sulfoxide (DMSO) [5]. In this case, most erythrocytes after thawing and washing from the cryoprotectant as well as transfer to physiological conditions are well preserved [6]. However, cryopreserved by this method erythrocytes have not yet been used for transfusions when treating the babesiosis in dogs.

The purpose of the research was by examining hematological parameters to assess the therapeutic efficiency of transfusion of the cryopreserved



методикою еритроцити ще не застосовувалися для трансфузій під час лікування хворих на бабезіоз собак.

Мета роботи – оцінка за гематологічними показниками лікувальної ефективності переливання кріоконсервованих під захистом диметилсульфоксиду еритроцитів хворим на бабезіоз собакам для коригування анемії.

Матеріали та методи

Експерименти проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорсткого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006) з дотриманням вимог комісії з біоетики Харківської державної зооветеринарної академії, узгоджених із положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

У роботі досліджували еритроцити собак. Усі тварини були клінічно здоровими, статевозрілими (2–10 років), безпородними самцями, які утримувалися у комунальному закладі «Центр поводження з тваринами» (м. Харків, Україна).

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

Еритроцити заморожували з 20%-м ДМСО, який готували на основі 200 mM сахарози, 50 mM NaCl, 10 mM фосфатного буфера, pH 7,4. Кріопротектор додавали до клітин у співвідношенні 1:1 й інкубували з кріопротекторним розчином перед заморожуванням протягом 20 хв за кімнатної температури (22°C). Еритроцити заморожували в кріопробірках 10 мл («Eppendorf», Німеччина) шляхом їх занурення в рідкий азот (-196°C). Кріоконсервовану масу зберігали не менше місяця. Відігрівання зразків проводили шляхом перенесення контейнера з рідкого азоту на водяну баню (40–42°C) з постійним погодюванням до зникнення твердої фази. Кріопротектор видаляли послідовним центрифугуванням при 750g: етап 1 – відмивання рівним об'ємом розчину 600 mM NaCl, 10 mM фосфатним буфером (pH 7,4); етапи 2 й 3 – відмивання рівними об'ємами розчином 150 mM NaCl, 10 mM фосфатного буфера (pH 7,4). Деконсервовані таким чином еритроцити використовували для переливання.

dimethyl sulfoxide-protected erythrocytes to the dogs with babesiosis to correct anemia.

Materials and methods

The experiments were performed in accordance with the Law of Ukraine 'On Protection of Animals Against Cruelty' (№ 3447-IV of February 21st, 2006) in compliance with the requirements of the Commission in Bioethics of the Kharkiv State Veterinary Academy, agreed with the 'European Convention for the Protection of Vertebrate Animals and Other Scientific Purposes' (Strasbourg, 1986).

In this research we studied canine erythrocytes. All animals were clinically healthy, sexually mature (2–10 years old), outbred males kept at the Animal Housing Center (Kharkiv, Ukraine).

Blood was collected with glucose-citrate preservative and stored for experiments not longer than 48 hours at 5°C. Erythrocytes were obtained by centrifugation of whole blood at 750 g 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)).

Erythrocytes were frozen with 20% DMSO, prepared on the basis of 200 mM sucrose, 50 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer, pH 7.4. The cryoprotectant was added to the cells in a 1:1 ratio and incubated with the cryoprotectant solution prior to freezing for 20 min at room temperature (22°C). Erythrocytes were frozen in 10 ml cryotubes (Eppendorf, Germany) by immersing them into liquid nitrogen (-196°C). The cryopreserved mass was stored for at least a month. The samples were heated by transferring the container from liquid nitrogen to a water bath (40–42°C) with constant shaking until the solid phase disappearance. The cryoprotectant was removed by sequential centrifugation at 750 g: step 1 – washing with an equal volume of 600 mM NaCl solution, 10 mM phosphate buffer (pH 7.4); steps 2 and 3 – washing in equal volumes with a 150 mM NaCl solution, 10 mM phosphate buffer (pH 7.4). Erythrocytes thawed thereby were used for transfusion.

The hemolysis rate was determined with a 'SF-46' spectrophotometer (LOMO, Russia) by the amount of free hemoglobin releasing from the cells, and expressed as a percentage relative to 100% hemolysis of erythrocytes in the presence of 0.1% detergent triton X-100 (Applichem, Germany).

To detect babesia in erythrocytes, peripheral blood smears were examined [7] using a Leucodif reagent set (Erba Lachema, Czech Republic).

Treatment against parasites was performed by a single intramuscular injection of the antiprot-



Ступінь гемолізу визначали на спектрофотометрі «СФ-46» («ЛОМО», Росія) за кількістю вільного гемоглобіну, який вийшов із клітин, і виражали в процентах по відношенню до 100%-го гемолізу еритроцитів у присутності 0,1% детергенту тритону Х-100 («Applichem», Німеччина).

Для виявлення в еритроцитах бабезій досліджували мазки периферичної крові [13] за допомогою набору реагентів «Лекодиф» («Erba Lachema», Чехія).

Лікування від паразитів проводили шляхом одноразового внутрішньом'язового введення антипротозойного препарату «Піро-Стоп» («Апи-Сан», Росія), який є достатньо ефективним і малотоксичним [8] у дозі 0,25 мл/кг маси тварини. Через 24 години після введення препарату проводили повторний клінічний аналіз крові. У тих випадках, коли не було статистично значущих покращень показників крові та зберігалися виражені симптоми захворювання (відсутність апетиту, підвищена температура), проводили трансфузію деконсервованих еритроцитів з метою відновлення гематологічних показників. Контроль над відновленням основних характеристик крові здійснювали шляхом проведення аналізу крові через кожні 24 години протягом 4-х діб.

Трансфузію еритроцитів здійснювали через 24 години після ін'єкції препарату «Піро-Стоп». Перед трансфузією суспензію еритроцитів розбавляли 0,9%-м розчином NaCl до 45%-го гематокриту.

Необхідну кількість еритроцитів для трансфузії розраховували за формулою [18]:

$$K \times MT \times \frac{HCT_n - HCT_r}{HCT_d},$$

де K – постійний коефіцієнт ($K = 90$); MT – маса тіла реципієнта (кг), HCT_n – необхідний гематокрит для реципієнта (%); HCT_r – гематокрит реципієнта (%); HCT_d – гематокрит донора (%).

Усіх тварин було розділено на експериментальні групи: 1 – клінічно здорові (контрольна група); 2 – хворі на бабезіоз до лікування; 3 – хворі на бабезіоз через 24 години після терапії препаратом; 4 – хворі на бабезіоз через 48 годин після терапії та 24 години після трансфузії; 5 – хворі на бабезіоз через 96 годин після терапії та 72 години після трансфузії.

Загальні клінічні дослідження крові проводили на автоматичному гематологічному аналізаторі «LabAnalit-2700» («URIT Medical Electronic Co.», Китай).

Статистичну обробку результатів виконували з використанням програмного пакета «Statgraphics» («Manugistic Inc.; STATistical GRAPHICS

zoal drug Pyro-Stop (Api-San, Russia), which is quite effective and low-toxic [19] at a dose of 0.25 ml / kg body weight. Twenty-four hours after drug administration, a repeated clinical blood test was performed. In cases where there were no significant improvements in blood parameters and severe symptoms of the disease persisted (lack of appetite, fever), the thawed erythrocytes were transfused to restore hematological parameters. The restoration of the main characteristics of blood was controlled by its testing every 24 hours for 4 days.

Erythrocyte transfusion was performed 24 hours after injection of Pyro-Stop. Prior to transfusion, the erythrocyte suspension was diluted with 0.9% NaCl solution to 45% hematocrit.

The required number of erythrocytes for transfusion was calculated by the formula [13]:

$$C \times BW \times \frac{Htn - Htr}{Htd},$$

where, C is a constant coefficient ($K = 90$); BW – body weight of the recipient (kg), Htn – necessary hematocrit for the recipient (%); Htr – hematocrit of the recipient (%); Htd – donor hematocrit (%).

All animals were divided into experimental groups: 1 – clinically healthy dogs (control group); 2 – dogs with babesiosis before treatment; 3 – dogs with babesiosis 24 hours after drug therapy; 4 – dogs 48 hours after therapy and 24 hours after transfusion; 5 – dogs with babesiosis 96 hours after therapy and 72 hours after transfusion.

General clinical blood tests were performed with automatic hematology analyzer 'LabAnalit-2700' (URIT Medical Electronic Co., China).

The results were statistically processed using the 'Statgraphics' software (Manugistic Inc.; STATistical GRAPHICS system, USA). Data were presented as $M \pm SE$ (mean \pm standard error). The significance of the differences between the experimental and control groups was assessed by a nonparametric method using a multiple Fisher rank test by grouping the samples with the least significant difference. At least four experiments were performed in each series.

Results and discussion

Babesia enter the bloodstream of animals via a tick bite, followed by penetration into the erythrocyte, wherein they multiply and destroy the cell [17]. At the same time sick dogs have an increased temperature of 40–41°C, loss of appetite, depressed mood, weak filiform pulse, tachycardia (130–150 beats/min), accelerated (20–30 beats/min) and difficulty when breathing. The mucous membranes of the oral cavity



system», США). Дані були представлені у вигляді $M \pm SE$ (середнє значення \pm стандартна похибка). Значущість відмінностей між експериментальними та контрольною групами оцінювали непараметричним методом за допомогою множинного рангового тесту Фішера за процедурою угруповання вибірок із найменшою значущою різницею. У кожній серії проведено не менше чотирьох дослідів.

Результати та обговорення

Через укуси кліща бабезії потрапляють до кровотоку тварин із подальшим проникненням у еритроцит, у якому вони розмножуються і руйнують клітину [21]. При цьому у хворих собак спостерігаються підвищення температури до 40–41°C, відсутність апетиту, пригнічений стан, слабкий ниткоподібний пульс, тахікардія (130–150 ударів/хв), прискорене (20–30 ударів/хв) і утруднене дихання. Слизові оболонки ротової порожнини та кон'юнктиви набувають жовтуватого відтінку. Крім цього, у заражених тварин спостерігається слюзотеча, прозорі (без кольору або ледь жовто-рожеві) виділення з носа, сеча має світло-жовтий колір.

Для трансфузії використовували кріоконсервовані еритроцити, які були заготовлені заздалегідь і зберігалися в контейнерах, занурених у рідкий азот (–196°C). У процесі заморожування-відігріву та наступних етапів видалення кріопротектора еритроцитів втрачалось близько 20%. Даний ефект можна вважати позитивним, оскільки за рахунок багаторазового відмивання від кріопротектора розморожена суспензія еритроцитів позбавлена залишків донорської плазми, що дозволяє отримати імунологічно безпечний компонент крові. Рішення щодо переливання приймали за результатами мікроскопічного дослідження мазків крові, вираженості симптомів захворювання та ступеня порушень гематологічних показників (різке зменшення кількості еритроцитів, зниження рівня гемоглобіну та гематокриту), оскільки патогенетичний вплив мікроорганізму, в першу чергу, відбивається на показниках крові, які змінюються залежно від інтенсивності інвазії. В мазках крові від дня підвищення температури спостерігали паразитів *B. canis*, які достатньо швидко розмножувалися (рис. 1).

Клінічний аналіз крові дослідних хворих тварин порівняно з контрольними показав різке зниження кількості еритроцитів (до 44%), гематокриту (до 54 %) і гемоглобіну (до 53%). Отримані дані дозволяють зробити висновок, що у цих тварин розвивається гемолітична анемія (таблиця).

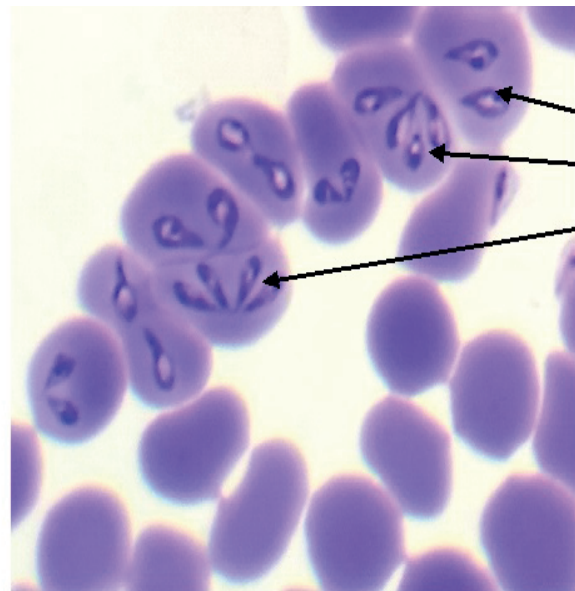


Рис. 1. Мазки крові хворих на бабезіоз собак. Стрілками позначено еритроцити, які містять мікроорганізми *Babesia canis*.

Fig. 1. Blood smears of dogs with babesiosis. The arrows indicate erythrocytes that contain the *Babesia canis* microorganisms.

and conjunctiva become yellowish. In addition, infected animals have tearing, transparent (colorless or slightly yellow-pink) discharge from a nose, their urine is light yellow.

Cryopreserved erythrocytes were used for transfusion, which were prepared in advance and stored in the containers immersed into liquid nitrogen (–196°C). During freeze-warming and subsequent stages of the cryoprotectant removal, the erythrocytes lost about 20%. This effect can be considered positive, because due to repeated washing from the cryoprotectant the thawed suspension of erythrocytes is devoid of donor plasma residues, which allows to obtain an immunologically safe component of blood. The decision to transfuse was made based on the results of microscopic examination of blood smears, the severity of symptoms and the extent of blood disorders (a sharp decrease in erythrocytes, reduced hemoglobin and hematocrit), because the pathogenetic effects of the microorganism primarily affect blood parameters, changing depending on intensity of invasion. In blood smears from the day of temperature rise, *B. canis* parasites were observed, which multiplied rather quickly (Fig. 1).

Clinical analysis of the blood of experimental sick animals compared with controls showed a sharp decrease in the number of erythrocytes (up to 44%), hematocrit (up to 54%) and hemoglobin (up to 53%). The data obtained allow us to conclude that these animals develop hemolytic anemia (Table).



На рис. 2 представлено загальні показники крові собак до та після лікування. Кількість еритроцитів у крові є основним фізіологічним показником розвитку патології при бабезіозі. Встановлено, що у хворих собак значно зменшена кількість еритроцитів, а через 24 години після медикаментозного лікування даний показник не підвищився і становив близько 46% порівняно з контрольною групою (рис. 2, А). Після гемотрансфузії разом із медикаментозним лікуванням він збільшився і на другу добу складав 72%, а на третю – 90%.

Одночасно зі зменшенням кількості еритроцитів у хворих на бабезіоз собак спостерігалось й зниження рівня гемоглобіну у два рази (рис. 2, В). Після комплексної медикаментозної терапії з використанням гемотрансфузії цей показник збільшувався лише на третю добу і складав близько 75% порівняно з клінічно здоровими собаками.

Рівень гематокриту залежить від загальної кількості еритроцитів та їх середнього об'єму [20, 26]. Нами виявлено значно знижений рівень гематокриту, що свідчить про помітне порушення структури і функцій еритроцитів (рис. 2, С). Після медикаментозного лікування та переливання крові цей показник поступово збільшувався до 62% на другу добу і досягав 76% на третю.

Оцінка загальних показників крові хворих на бабезіоз собак показала позитивний вплив гематрансфузії на їх загальний стан, що прискорює одужання. На третю добу комплексного лікування рівні гемоглобіну та гематокриту були зменшені, але вже значно підвищені, ніж у нелікованих хворих тварин. При цьому вже на третю добу кількість еритроцитів значуще не відрізнялася від показників контрольної групи. Таким чином, використані для трансфузії кріоконсервовані еритроцити залишаються в руслі крові тварин життєздатними, виконують свої функції, що покращує стан хворої тварини.

Поняття середнього об'єму еритроцита, середнього вмісту та середньої концентрації в ньому гемоглобіну були вперше введені В.В. Wintrobe [27]. Ці показники (індекси еритроцитів) необхідні для з'ясування етіології анемії.

Дослідження показали, що об'єм еритроцитів у хворих собак мав тенденцію до зменшення (рис. 3, А), що може додатково обумовлювати недостатність вмісту гемоглобіну. Після засто-

Гематологічний профіль собак ($M \pm SE$)
Hematological parameters in dogs ($M \pm SE$)

Показник Parameter	Норма Norm	Клінічно здорові тварини (контрольна група) Clinically healthy animals (control)	Хворі на бабезіоз тварини Animals with babesiosis
Кількість еритроцитів, $\times 10^{12}/л$ Number of erythrocytes $\times 10^{12}/l$	5,6–8,0	5,86 \pm 0,12	2,55 \pm 0,29*
Концентрація гемоглобіну, г/л Hemoglobin concentration, g/l	120–180	140,51 \pm 2,87	73,5 \pm 6,06*
Рівень гематокриту, % Hematocrit level, %	37–55	40,50 \pm 1,35	21,85 \pm 2,41*

Примітка: * – підвищення значуще відносно контрольної групи, $p < 0,05$.
Note: * – significant increase relative to the control group, $p < 0.05$.

Figure 2 shows the general blood counts in dogs before and after treatment. The number of erythrocytes in blood is the main physiological indicator of developing pathology after babesiosis. It was found that the number of canine erythrocytes was significantly reduced, and 24 hours after drug treatment, this value did not increase and was about 46% compared with the control group (Fig. 2A). After blood transfusion together with drug treatment, it increased and on the second day that was 72%, and on the third it made 90%.

Simultaneously with the reduced number of erythrocytes in the dogs with babesiosis, the level of hemoglobin decreased twice (Fig. 2B). After combining the drug therapy with blood transfusion, this value increased only on the third day and made about 75% compared with clinically healthy dogs.

Hematocrit levels depend on the total number of erythrocytes and their average volume [16, 23]. We found a notably reduced level of hematocrit, indicating a marked disorder in the structure and function of erythrocytes (Fig. 2C). After medical treatment and blood transfusion, this value gradually increased up to 62% on the second day and reached 76% on the third.

Evaluation of the general blood parameters of the dogs with babesiosis demonstrated a positive effect of blood transfusion on their general condition, which accelerates recovery. On the third day of combined treatment, hemoglobin and hematocrit levels were reduced, but already significantly increased than in untreated sick animals. At the same time on the third day the number of erythrocytes does not differ significantly from the control group. Thus, the cryopreserved erythrocytes used for transfusion remain viable in the bloodstream of the animals, perform their functions, improving the state of a sick animal.

The concepts of mean erythrocyte volume, mean content and mean hemoglobin concentration were

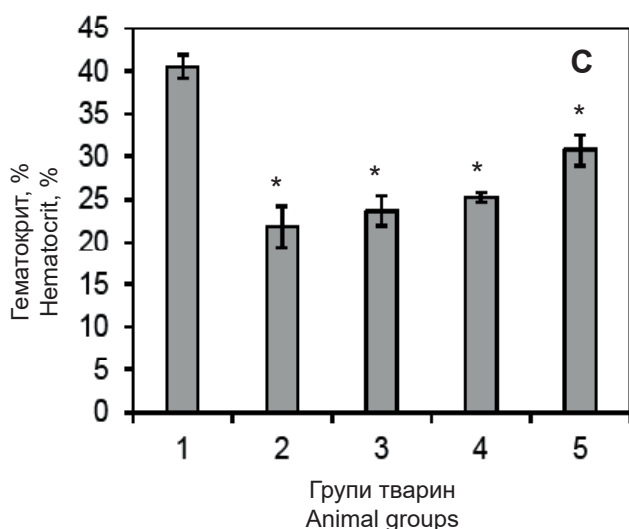
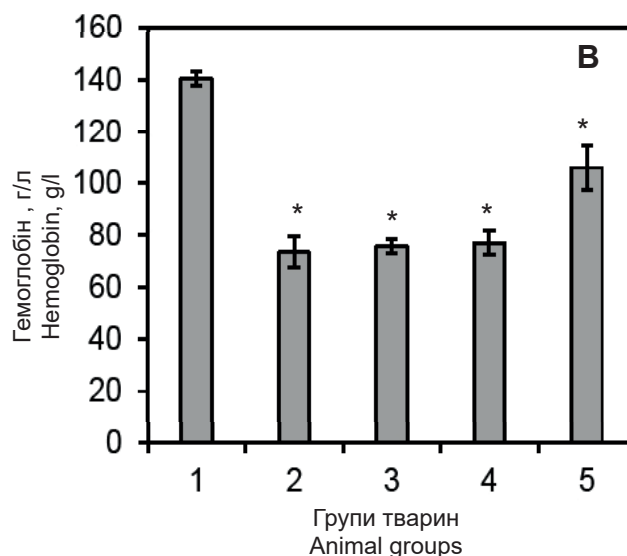
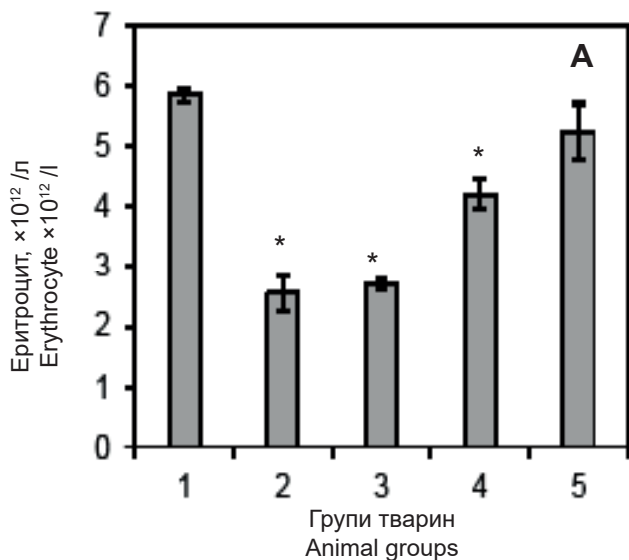


Рис. 2. Загальні показники крові хворих на бабезіоз собак після комплексного лікування з використанням трансфузії кріоконсервованих еритроцитів: **A** – кількість еритроцитів; **B** – гемоглобін; **C** – гематокрит. * – відмінності значущі відносно контролю, $p < 0,05$; 1 – контрольна група; 2 – хворі на бабезіоз до лікування; 3 – хворі через 24 години після терапії препаратом; 4 – хворі через 48 годин після терапії і 24 години після трансфузії; 5 – хворі через 96 годин після терапії та 72 години після трансфузії.

Fig. 2. General blood counts in dogs with babesiosis after complex treatment using transfusion of cryopreserved erythrocytes: **A** – number of erythrocytes; **B** – hemoglobin; **C** – hematocrit. * – differences are significant if compared with the control, $p < 0.05$; 1 – control group; 2 – dogs with babesiosis before treatment; 3 – dogs 24 hours after drug therapy; 4 – dogs 48 hours after therapy and 24 hours after transfusion; 5 – dogs 96 hours after therapy and 72 hours after transfusion.

сування трансфузії цей показник збільшився і поступово наближався до норми.

Середній вміст гемоглобіну (абсолютна маса всіх гемоглобінових молекул) в одному еритроциті опосередковано характеризує особливості функціонування внутрішніх систем, які відповідають за синтез гемоглобіну, а також за нормальне утворення еритроцитів [7, 26]. У хворих собак цей показник залишався у межах норми (рис. 3, B), але складав 85% від значень контрольної групи, проте без значущих відмінностей. На останньому етапі лікування середній вміст гемоглобіну в крові складав 90% від контрольної групи, тобто кількість гемоглобіну в клітинах збільшилася.

Концентрація гемоглобіну свідчить про «щільність» заповнення ним клітини. Цей показник у всіх групах тварин знаходиться у межах норми (рис. 3, C), тобто щільність розміщення гемоглобіну в еритроцитах не порушувалася. Крім того, за цим показником можна робити вис-

first introduced by B.B. Wintrobe [24]. These indices (erythrocyte ones) are needed to determine the etiology of anemia.

Studies have shown that the volume of erythrocytes in sick dogs tended to decrease (Fig. 3A), which may further lead to a lack of hemoglobin. After the application of transfusion, this value increased and gradually approached normal.

The average content of hemoglobin (absolute mass of all hemoglobin molecules) in one erythrocyte indirectly characterizes the peculiarities of the functioning of internal systems responsible for hemoglobin synthesis, as well as for the normal formation of erythrocytes [14, 23]. In sick dogs, this value remained within the normal limits (Fig. 3B), but made 85% of the control group values, even so without significant differences. At the last stage of treatment, the mean concentration of hemoglobin was 90% of the control group, *i. e.* the amount of hemoglobin in the cells increased.



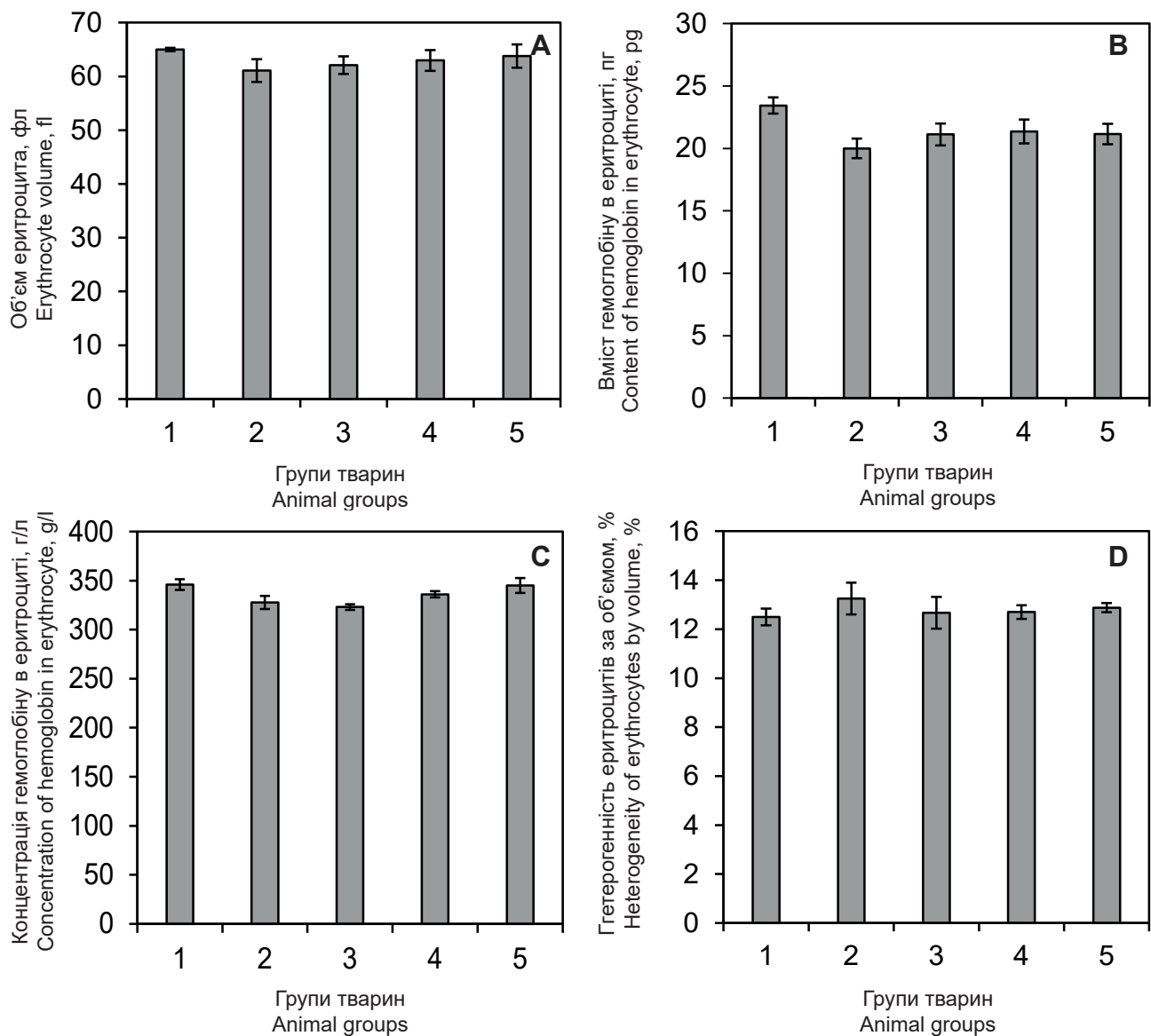


Рис. 3. Характеристика еритроцитів крові хворих на бабезіоз собак після комплексного лікування з використанням трансфузії криоконсервованих еритроцитів: **A** – середній об'єм еритроцита; **B** – середній вміст гемоглобіну в еритроциті; **C** – середня концентрація гемоглобіну в еритроциті; **D** – ступінь гетерогенності еритроцитів за об'ємом. 1 – контрольна група; 2 – хворі на бабезіоз до лікування; 3 – хворі через 24 години після терапії препаратом; 4 – хворі через 48 годин після терапії і 24 години після трансфузії; 5 – хворі через 96 годин після терапії та 72 години після трансфузії.

Fig. 3. Characteristics of blood erythrocytes of dogs with babesiosis after combined treatment with the use of transfusion of cryopreserved erythrocytes: **A** – average erythrocyte volume; **B** – average content of hemoglobin in erythrocyte; **C** – mean concentration of hemoglobin in erythrocyte; **D** – degree of heterogeneity of erythrocytes by volume. 1 – control group; 2 – dogs with babesiosis before treatment; 3 – dogs 24 hours after drug therapy; 4 – dogs 48 hours after therapy and 24 hours after transfusion; 5 – dogs 96 hours after therapy and 72 hours after transfusion.

новки щодо значущих результатів зробленого аналізу, оскільки він не може бути вище норми [7].

Ступінь гетерогенності (розподілу) еритроцитів за об'ємом або індекс анізоцитозу еритроцитів у всіх групах статистично не відрізнявся (рис. 3, D). Таким чином, проведена трансфузія криоконсервованих еритроцитів не призводить до формування неоднорідних за розміром клітин.

The concentration of hemoglobin indicates the 'density' of filling the cell. This index in all groups of animals was within the norm (Fig. 3C), *i. e.* the density of hemoglobin in erythrocytes was not disordered. In addition, this index can be used to conclude about the significant results of the analysis, as it cannot be higher than normal [14].

The degree of heterogeneity (distribution) of erythrocytes by volume or erythrocyte anisocytosis index in all groups did not differ statistically (Fig. 3D).

Індекси еритроцитів показують загальний стан організму та його гемостаз. З урахуванням відсутності значущих відмінностей цих показників, можна припустити, що *Babesia canis*, яка викликає паразитарне захворювання крові, не впливає на процеси синтезу та щільності розміщення гемоглобіну в клітині. Крім цього, трансфузія також не впливає на індекси гематологічних показників еритроцитів.

У результаті комплексної терапії підвищилися кількість еритроцитів, рівень гемоглобіну та гематокриту, покращився загальний стан хворих. Трансфузія розморожених еритроцитів дозволила в короткі строки компенсувати анемію та відновити оксигентранспортну функцію крові. Таким чином, трансфузія кріоконсервованих еритроцитів може бути рекомендована для комплексного лікування хворих бабезіозом собак.

Відмиті розморожені еритроцити порівняно зі свіжою кров'ю, що зберігалася при гіпотермії, є нешкідливими (ареактогенними), оскільки в процесі заморожування-відігріву були видалені лейкоцити, тромбоцити, білки плазми, антитіла та мікроагрегати.

Однак на сьогодні розроблено дуже мало технологій та протоколів кріоконсервування еритроцитів тварин. Існують поодинокі праці щодо заморожування еритроцитів собак, у яких в якості кріопротектора використовували гліцерол [10, 16], диметилсульфоксид (ДМСО) [1, 2], гідроксиетильований крохмаль (ГЕК) [16, 17, 23], поліетиленгліколь м. м. 1500 (ПЕГ-1500) [1, 2]. Застосування непроникних кріопротекторів (ПЕГ-1500 і ГЕК) було безрезультатним, оскільки після розморожування спостерігається нестабільність еритроцитів, яка обумовлена порушенням складу білків мембрано-цитоскелетного комплексу [4, 5, 22]. Внаслідок таких процесів відбувається руйнування еритроцитів у ізотонічному середовищі [14], що може призвести до значного внутрішньосудинного гемолізу. Гліцерол також був недостатньо ефективним, бо він проникає в еритроцити собак набагато повільніше, ніж в еритроцити людини [3]. Тому під час заморожування клітин крові собак до -196°C шляхом занурення у рідкий азот вказаний кріопротектор не забезпечує необхідний їх захист від факторів низькотемпературного пошкодження.

За нашими даними [1, 2] ДМСО показав достатню високу ефективність під час кріоконсервування еритроцитів собак. Оскільки ДМСО в більших концентраціях є токсичною речовиною [6], то потрібно дуже ретельно дотримуватися протоколів кріоконсервування. На сьогодні ДМСО у невеликих концентраціях використо-

Thus, the transfusion of cryopreserved erythrocytes does not result in the formation of inhomogeneous cells.

Erythrocyte indices show the general condition of the body and its hemostasis. Assuming the absence of significant differences in these indices, we can suppose that *Babesia canis*, which causes parasitic blood disease, does not affect the hemoglobin synthesis and density in the cell. As well transfusion also does not affect the indices of hematological parameters of erythrocytes.

As a result of combined therapy, the number of erythrocytes, level of hemoglobin and hematocrit were increased, and the general condition of patients improved. Transfusion of thawed erythrocytes in a short time enabled the compensation of anemia and restoration of oxygen transport function of blood. Thus, transfusion of cryopreserved erythrocytes can be recommended for a comprehensive treatment of the dogs with babesiosis.

Washed and thawed erythrocytes are harmless (areactogenic) compared to fresh blood stored during hypothermia, as leukocytes, platelets, plasma proteins, antibodies and microaggregates have been removed during the freeze-thaw process.

However, to date, very few technologies and protocols for cryopreservation of animal erythrocytes have been developed. There are scanty reports on freezing erythrocytes of dogs, in which glycerol was used as a cryoprotectant [2, 10], dimethyl sulfoxide (DMSO) [5, 6], hydroxyethylated starch (HEC) [9, 12, 20], polyethylene glycol m. m. 1500 (PEG-1500) [5, 6]. The use of impermeable cryoprotectants (PEG-1500 and HEC) was ineffective, because after thawing there is an instability of erythrocytes, which is due to a disordering of the membrane-cytoskeletal complex protein composition [18, 26, 27]. As a result of such processes, erythrocytes are destroyed in an isotonic environment [8], which can lead to strong intravascular hemolysis. Glycerol was also slightly effective because it penetrates into canine erythrocytes much more slowly than into human erythrocytes [28]. Therefore, when freezing the blood cells of dogs to -196°C by immersion into liquid nitrogen, this cryoprotectant does not properly protect against the factors of low-temperature damage.

According to our data [5, 6] DMSO showed a fairly high efficiency during cryopreservation of canine erythrocytes. Since DMSO in high concentrations is a toxic substance [11], cryopreservation protocols must be followed very carefully. Today DMSO in small concentrations is used in veterinary practice [21, 25], and in the last years of the twentieth century the World Health Organi-



вують у ветеринарній практиці [24, 28], а в останні роки ХХ століття Всесвітньою організацією охорони здоров'я було дозволено його застосування у якості кріопротектора з обов'язковим відмиванням кріоконсервованих біооб'єктів перед використанням. На нашу думку, ДМСО є найбільш перспективним кріопротектором для низькотемпературного зберігання еритроцитів собак з подальшим використанням із лікувальною метою, оскільки результати експериментів показали, що трансфузія кріоконсервованих еритроцитів суттєво покращує гематологічний профіль собак під час лікування бабезіозу.

Висновки

1. Переливання кріоконсервованих еритроцитів для лікування хворих на бабезіоз собак разом зі симптоматичною і специфічною терапією показало високу ефективність.

2. Трансфузія розморожених еритроцитів сприяє кращому відновленню кількості еритроцитів, нормалізації рівня гемоглобіну та гематокриту, що разом із протипаразитарною терапією приводить до швидкого одужання.

3. Введення ДМСО в якості захисної сполуки в концентрації 20% може бути використаним для створення запасів кріоконсервованої крові собак.

Впровадження технології кріоконсервування еритроцитів тварин у ветеринарну практику дозволить створити стратегічний ефективний резерв крові компанійських тварин. Наявність банків кріоконсервованих еритроцитів допоможе уникнути проблем забезпечення ветеринарних клінік компонентами крові.

Література

1. Денисова ОН, Жегунов ГФ, Бабийчук ЛА. Криоконсервирование эритроцитов животных под защитой диметилсульфоксида, полиэтиленгликоля и глицерина. Проблемы криобиологии. 2005; 15 (2): 196–201.
2. Денисова ОН, Жегунов ГФ, Землянских НГ. Стійкість еритроцитів тварин проти впливу низьких температур. Науковий вісник Національного аграрного університету. 2008; 126: 67–75.
3. Жегунов ГФ, Денисова ОН. Проницаемость эритроцитов млекопитающих для молекул глицерина и ДМСО и степень сохранности после замораживания-оттаивания. Доповіді національної академії наук України. 2010; 12: 139–43.
4. Землянских НГ, Бабийчук ЛА. Пространственно-конформационные модификации белков мембрано-цитоскелетного комплекса криоконсервированных эритроцитов. Биологические мембраны. 2019;36 (2), 125–36.

zation allowed its use as a cryoprotectant with mandatory washing of cryopreserved biological objects before using. We believe that DMSO is the most promising cryoprotectant for low-temperature preservation of canine erythrocytes and their subsequent use for therapeutic purposes, as the findings have shown that transfusion of such cryopreserved erythrocytes significantly improves the hematological parameters in dogs when treating babesiosis.

Conclusions

1. Transfusion of cryopreserved erythrocytes to treat the dogs with babesiosis together with symptomatic and specific therapy has shown high efficiency.

2. Transfusion of thawed erythrocytes promotes better recovery of erythrocytes, hemoglobin and hematocrit, which jointly with anti-parasitic therapy contributes to a rapid recovery.

3. The application of 20% DMSO as a protective compound can be used to create the stocks of cryopreserved canine blood.

Introduction of technologies of erythrocytes cryopreservation of animals in veterinary practice will allow to create a strategic and effective blood reserve of company animals. The presence of banks of cryopreserved erythrocytes will help to avoid the problems of providing veterinary clinics with blood components.

References

1. Aktaran Bala D, Özcan M. The effects of freezing on long-term storage of canine erythrocytes. Pol J Vet Sci. 2016; 19(2):401–6.
2. Contreras TJ, Lindberg JR, Lowrie GB, et al. Liquid and freeze-preservation of dog red blood cells. Transfusion. 1979; 19 (3): 279–92.
3. Cotter S.M. Advances in veterinary science and comparative medicine: comparative transfusion medicine, V. 36, San Diego: Academic Press, , 1991. 343 p.
4. 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.
5. Denisova ON, Zhegunov GF, Babijchuk LA. Cryopreservation of animal's erythrocytes under dimethyl sulfoxide, polyethylene oxide and glycerol protection. Problems of Cryobiology. 2005; 15 (2): 195–201.
6. Denysova ON, Zhegunov GF, Zemlianskykh NG. [Resistance of erythrocytes of animals against the influence of low temperatures.] Naukovyi Visnyk Natsionalnogo Agrarnogo Universytetu. 2008; 126: 67-75. Ukraine



5. Землянских НГ, Денисова ОН. Изменения в мембрано-цитоскелетном комплексе эритроцитов, индуцированные диметилсульфоксидом, полиэтиленгликолем и низкой температурой. *Биофизика*. 2009; 54 (4): 490–6.
6. 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.
7. Мейер Д, Харви Д. *Ветеринарная лабораторная медицина. Интерпретация и диагностика*. Москва: Софион; 2007. 456 с.
8. Смирнов АА, Федосов АА, Климов ПВ. Препарат «Пиро-Стоп» – современное и эффективное решение в борьбе с кровепаразитарными болезнями животных. *Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии*. 2011; (1): 45–7.
9. Aktaran Bala D, Özcan M. The effects of freezing on long-term storage of canine erythrocytes. *Pol J Vet Sci*. 2016; 19(2): 401–6.
10. Contreras TJ, Lindberg JR, Lowrie GB, et al. Liquid and freeze-preservation of dog red blood cells. *Transfusion*. 1979; 19 (3): 279–92.
11. Cotter SM. *Advances in veterinary science and comparative medicine: comparative transfusion medicine*. San Diego: Academic Press; 1991. 343 p.
12. 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.
13. Dobry E, Novac J. *Hematologie a transfuzni sluzba, Zdravotnicke actuality 211*, Praha: Avicenum; 1987. 188 p.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Leisewitz AL, Guthrie AJ, Berry WL. Evaluation of the effect of whole – blood transfusion on the oxygen status and acid-base balance of Babesia canis infected dogs using the oxygen status algorithm. *J S Afr Vet Assoc*. 1996; 67 (6): 20–6.
19. Pogozhykh D, Pakhomova Y, Pervushina O, et al. Exploring the possibility of cryopreservation of feline and canine erythrocytes by rapid freezing with penetrating and non-penetrating cryoprotectants. *PLoS One* [Internet]. 2017 Jan 10 [cited 2020 May 29]; Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0169689>.
20. Rozanski E, de Laforcade AM. Transfusion medicine in veterinary emergency and critical care medicine. *Clin Tech Small Anim Pract*. 2004; 19: 83–7.
21. Sant'Anna Leal PD, Flausino W, Gomes Lopes CW. [Diagnosis of concomitant infections due to Neospora caninum, Babesia canis and Ehrlichia spp. in adult canine Golden Retriever breed – Case report]. *Rev Brasileira de Med Vet*. 2012; 34 (1): 47–51. Portuguese.
22. Singbartl K, Langer R, Henrich A. Altered membrane skeleton of hydroxyethylstarch-cryopreserved human erythrocytes. *Cryobiology*. 1998; 36 (2): 115–23.
23. 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.
24. Swanson BN. Medical use of dimethyl sulfoxide (DMSO). *Rev Clin Basic Pharm*. 1985; 5(1-2):1–33.
25. Wardrop KJ, Owen TJ, Meyers KM. Evaluation of an additive solution for preservation of canine red blood cells. *J Vet Intern Med*. 1994; 8: 253–7.
26. Weiss DJ, Wardrop KJ, editors. *Schalm's veterinary hematology*. Singapore: Wiley; 2010. 1232 p.
27. Wintrobe MM. Principles of hematologic examination. In: Wintrobe MM, editor. *Clinical hematology*. 8th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1981. p. 7–19.
28. Wong LK, Reinertson EL. Clinical considerations of dimethyl sulfoxide. *Iowa State University Veterinarian*. 1984; 46 (2): 89–95.
29. Zemlianskykh NG, Babijchuk LA. [Spatial-conformational modifications of proteins in membrane]. *Biologicheskieskie membrany*. 2019; 36 (2): 125–36. Russian.



24. Swanson BN. Medical use of dimethyl sulfoxide (DMSO). *Rev Clin Basic Pharm.* 1985; 5(1-2):1–33.
25. Wardrop KJ, Owen TJ, Meyers KM. Evaluation of an additive solution for preservation of canine red blood cells. *J Vet Intern Med.* 1994; 8: 253–7.
26. Weiss DJ, Wardrop KJ, editors. *Schalm's veterinary hematology.* Singapore: Wiley; 2010. 1232 p.
27. Wintrobe MM. Principles of hematologic examination. In: Wintrobe MM, editor. *Clinical hematology.* 8th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1981. p. 7–19.
28. Wong LK, Reinertson EL. Clinical Considerations of Dimethyl Sulfoxide. *Iowa State University Veterinarian.* 1984; 46 (2): 89–95.
27. Zemlianskykh NG, Denisova ON. [Changes in erythrocyte membrane-cytoskeleton complex, induced by dimethylsulfoxide, polyethyleneglycol, and low temperature]. *Biofizika.* 2009; 54 (4): 490–6. Russian.
28. Zhegunov GF, Denisova ON. [Permeability of mammalian erythrocytes for the molecules of glycerol and DMSO and the level of cellular viability after freezing-thawing.] *Dopov Nac akad nauk Ukr.* 2010; 12: 139–43. Russian.

