

УДК 636.7:611.018.51:66.099

Г.Ф. Жегунов¹, О.М. Денисова^{1*}, Г.П. Жегунова²

Гіпотермічне зберігання крові та кріоконсервування еритроцитів собак

UDC 636.7:611.018.51:66.099

G.F. Zhegunov¹, O.M. Denysova^{1*}, G.P. Zhegunova²

Blood Hypothermic Storage and Erythrocyte Cryopreservation in Dogs

Реферат: В огляді представлено аналіз сучасної літератури щодо наявних методів гіпотермічного зберігання крові та кріоконсервування еритроцитів собак. Обґрунтовано актуальність розроблення та удосконалення методів кріоконсервування еритроцитів собак, створення кріобанків, а також застосування кріоконсервованих компонентів крові для трансфузії. Розглянуто особливості гіпотермічного зберігання крові собак, а також специфіку використання різних механізмів дії кріопротекторів під час кріоконсервування еритроцитів собак. Визначено переваги використання диметилсульфоксиду та комбінованих кріоконсервантів за умов низькотемпературного зберігання еритроцитів собак.

Ключові слова: еритроцити собак, гіпотермічне зберігання, кріоконсервування, гідроксиетильований крохмаль, диметилсульфоксид, гліцерол, поліетиленгліколь-1500.

Abstract: This review presents the analysis of reported data on the current methods for blood hypothermic storage and erythrocyte cryopreservation in dogs. The relevance of designing and improving the techniques for canine erythrocyte cryopreservation, cryobanking, as well as the application of cryopreserved blood components for transfusion were substantiated. The features of canine blood hypothermic storage and specific use of cryoprotectants with various modes of their action were considered. The advantages of applying DMSO and combined cryopreservatives during low temperature storage of canine erythrocytes were specified.

Key words: dog erythrocytes, hypothermic storage, cryopreservation, hydroxyethyl starch, dimethyl sulfoxide, glycerol, polyethylene glycol 1500.

На сьогодні в Україні застосування трансфузії крові стає все більш поширеним і важливим методом лікування та збереження життя собакам. Цей метод лікування є незамінним, коли рівень гематокриту у тварини складає менше 15% [9, 10]. Переливання крові завжди направлене на відновлення її об'єму та кількості компонентів, коли життя знаходиться під загрозою через велику втрату крові: під час хронічних кровотеч, хірургічних втручань, геморагічних гастроентеритів, дефіциту заліза, тяжких форм паразитарних захворювань. Переливання крові та зберігання її зразків — нерозривно пов'язані процедури.

Удосконалення техніки зберігання крові та її компонентів є дуже важливим етапом для створення банків крові. Зразки повинні бути використані відразу або зберігатися ефективніше.

Існують два методи зберігання крові та її компонентів: гіпотермічний та кріоконсервування. Метод гіпотермічного зберігання дозволяє використовувати компоненти крові нетривалий час

To date, the blood transfusion is becoming an increasingly common and important method for dog's life-saving therapy in Ukraine. This procedure is indispensable, when the hematocrit level in animal is less than 15% [4, 5]. Blood transfusion is always aimed to restore its volume and amount of components when life is threatened because of massive blood loss, *i. e.* during chronic bleeding, surgical interventions, hemorrhagic gastroenteritis, iron deficiency, severe forms of parasitic diseases. Blood transfusion and blood sample storage are closely linked procedures.

Improving the storage technique for blood and its components is a crucial stage in blood banking. The specimens should be used immediately or their storage needs to be more efficient.

There are two methods for blood and its component storage: hypothermia and cryopreservation. Hypothermic storage enables using blood components for a short time (within 20 days only), since because of no trophicity and oxygen presence, the

¹ Державний біотехнологічний університет, Інститут ветеринарної медицини та тваринництва, смт Мала Данилівка, Україна

² Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Академічна, 1, смт Мала Данилівка, Україна 62341;

тел.: (+38 057) 635-74-73

електронна пошта: denysova78@gmail.com

Надійшла 04.01.2021

Прийнята до друку 23.09.2022

¹ State Biotechnological University, Institute of Veterinary Medicine and Animal Husbandry, Mala Danylivka village, Ukraine

² National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:

1, Akademichna str., Mala Danylivka village, Ukraine 62341;

tel.: +380 57 635 7473

e-mail: denysova78@gmail.com

Received 04, January, 2021

Accepted 23, October, 2022

(лише протягом 20 діб), оскільки через відсутність трофіки та за наявності кисню зберігання *ex vivo* призводить до окисного стресу та біохімічних пошкоджень клітин [17, 20, 24, 38]. Крім того, за умов гіпотермічного зберігання (1–4°C) хімічні реакції відбуваються зі зниженою швидкістю, а це призводить до накопичення метаболітів, у результаті чого термін зберігання таких зразків крові стає дуже обмеженим.

За допомогою кріоконсервування можна зберігати зразки крові понад 10 років, оскільки біохімічні реакції практично припиняються і пошкодження еритроцитів не відбувається [11]. На сьогодні існує дуже мало досліджень, пов'язаних з кріоконсервуванням еритроцитів собак, які спрямовані на розроблення довготривалих методів збереження компонентів крові.

Мета роботи — аналіз сучасного стану проблеми довгострокового зберігання крові та еритроцитів собак.

Гіпотермічне зберігання крові собак та її компонентів. Актуальність проблеми довгострокового зберігання крові собак зумовлена збільшенням кількості собак-компаньйонів, зростанням у них числа гематологічних захворювань, відсутністю необхідної кількості донорів, а також складністю підбору крові за фенотиповими характеристиками (групами) [10].

Кров та її продукти можна зберігати в умовах гіпотермії за температури 4°C, проте нетривалий час. За умов гіпотермічного зберігання протягом кількох тижнів у холодильнику поступово погіршуються показники якості цільної крові [35]. Життєздатність і функції еритроцитів знижуються в результаті несприятливих фізичних і метаболічних процесів під час зберігання. На гематологічні, біохімічні та фізичні властивості цільної крові та її компонентів несприятливо впливають консерванти, контейнери, зниження температури і часте перемішування зразків.

Існують різні способи гіпотермічного зберігання донорської крові собак [12, 13, 25, 29, 36]. Відомо, що успішно зберігати кров або еритроцити при 4°C можливо тільки протягом 2–3 тижнів, що недостатньо для створення банків донорської крові тварин. Тому вдосконалення методів довгострокового зберігання еритроцитів собак залишається одним із важливих завдань ветеринарної медицини.

Гіпотермічне зберігання крові *ex vivo* вперше здійснили в 1915 р. після відкриття цитрату натрію як антикоагулянту [13]. Антикоагулянти, які перешкоджають згортанню крові, дозволяють зберігати еритроцити протягом обмежено-

ex vivo storage leads to oxidative stress and biochemical damage to cells [14, 17, 21, 35]. In addition, under hypothermic storage (1–4°C), the chemical reactions proceed with a reduced rate, entailing the metabolite accumulation, that significantly limits the storage period for these blood samples.

Cryopreservation allows blood samples to be stored for more than 10 years, since biochemical reactions are virtually stopped and no erythrocyte damages occur [6]. To date, the studies on canine erythrocyte cryopreservation aimed at designing the long-term techniques for blood component storage are rather scarce.

We here aimed to analyze the state of the art of blood and erythrocyte long-term storage in dogs.

Hypothermic storage of dog blood and its components. The relevance of the task of canine blood long-term storage is governed by growing number of companion dogs, the raise of hematological diseases among them, the lack of the required number of donors, as well as the difficulty of blood selection by phenotypic characteristics (groups) [5].

Blood and its products may be stored under hypothermia at 4°C, but for a short time. Under hypothermic storage within several weeks in a refrigerator, the quality indices of the whole blood gradually worsen [33]. A decrease in erythrocyte viability and functions results from adverse physical and metabolic processes during storage. Hematological, biochemical and physical properties of the whole blood and its components may be adversely affected by preservatives, containers, temperature reduction and frequent mixing of specimens.

There are different ways for the hypothermic storage of donated canine blood [9, 10, 22, 27, 34]. A successful storage of either blood or erythrocytes in domestic refrigerator is known to only be possible for 2–3 weeks that is insufficient for donated blood banking. Therefore, improving the techniques for canine erythrocyte long-term storage has still remained among the urgent tasks in veterinary medicine.

Blood was first *ex vivo* hypothermically stored in 1915 after discovering the sodium citrate as an anticoagulant [10]. The anticoagulants, preventing blood clotting, enable erythrocyte storage for a limited time period without worsening the viability and functions under hypothermia. Most of the sodium citrate-based anticoagulants and preservative solutions were originally designed for human blood preservation, but they occurred to be quite suitable



го періоду часу без погіршення життєздатності та функцій в умовах гіпотермії. Більшість антикоагулянтних і консервувальних розчинів на основі цитрату натрію спочатку були розроблені для консервування крові людини, але вони виявилися цілком задовільними для використання у ветеринарії. Проте термін зберігання еритроцитів в даному середовищі відрізняється у різних видів тварин [25, 29, 37]. Розчин цитрату натрію (3,8%) використовується для збору крові у співвідношенні 1 мл цитрату натрію до 9 мл крові. Однак він не має консервувальних властивостей і рекомендується тільки для негайного використання під час переливання крові. Для гіпотермічного зберігання крові собак збирають зазвичай у флакони з цитрат-декстрозним або цитрат-глюкозним середовищем [29, 36].

Для переливання свіжої цільної крові маленьким собакам використовується гепарин. Він не має консервувальних властивостей, тому гепаринізовану кров потрібно швидко перелити після забору. Зазвичай доза гепарину становить 5–10 одиниць на 1 мл крові.

Для гіпотермічного зберігання використовують складні розчини антикоагулянтів-консервантів. Основними є цитрат-декстрозний (ACD) і цитрат-фосфат-декстрозо-аденіловий (CPDA-1). Усі ці розчини містять декстрозу (субстрат для підтримки пулу АТФ гліколітичним шляхом в еритроцитах) та цитрат натрію (антикоагулянт).

За необхідності більш тривалого зберігання еритроцитів донорської крові їх відділяють від плазми центрифугуванням і поміщають у спеціальні ресуспендуючі розчини. Для собак зазвичай використовують Adsol [10] та Nutricel [25]. Це дозволяє продовжити термін зберігання їхніх еритроцитів з 20 до 35–37 діб.

В еритроцитах під час гіпотермічного зберігання відбуваються зміни, які впливають на виживання, функцію і реакцію реципієнта на переливання крові. В першу чергу, під час переміщення еритроцитів в умови *in vitro* порушується їхня трофіка [25, 36]. При цьому в умовах низьких температур послаблюються гідрофобні взаємодії [25], порушується розподіл фосfolіпідів у мембрані [19], змінюється транспорт іонів солей, надходження глюкози в клітини [35], знижується активність ферментів гліколізу [29] і синтез АТФ [25]. Це призводить до зниження активності Na, K-АТФаз та Ca-АТФаз мембран [8], що порушує іонний гомеостаз, змінює форму (ехіноцити, сфероцити, стоматоцити) і об'єм еритроцитів [5, 8, 25, 35, 39]. Усі ці зміни викликають підвищення осмотичної крихкості клітин і втрату функціональної повноцінності еритроцитів.

in veterinary medicine as well. However, the storage time for erythrocytes in this medium varies in different animal species [22, 27, 35]. Sodium citrate solution (3.8%) is used for blood collection in a 1:9 ratio of sodium citrate to blood. However, it has no preservative properties and is recommended for immediate use only during blood transfusion. For hypothermic storage, the canine blood is usually collected into vials with citrate-dextrose or citrate-glucose medium [27, 34].

Heparin is used to transfuse the fresh whole blood in small dogs. Since it has no preservative properties, a heparinized blood should be transfused immediately after collection. Usually, the dosage of heparin is 5–10 units per 1 ml of blood.

Combined anticoagulants-preservative solutions are used for hypothermic storage. The acid citrate-dextrose (ACD) solution and citrate-phosphate-dextrose-adenylate (CPDA-1) are among the basic ones. All these solutions contain dextrose (a substrate for ATP pool maintaining via glycolytic pathway in erythrocytes) and sodium citrate (an anticoagulant).

If longer storage of donated erythrocytes is required, they are separated from plasma by centrifugation and placed into special resuspending solutions. For dogs, among the commonly used ones are Adsol [5] and Nutricel [22]. This enables the prolongation of the storage time for canine erythrocytes from 20 to 35–37 days.

During hypothermic storage, the erythrocytes undergo the changes, affecting the recipient's survival, function, and response to blood transfusion. First of all, when transferring erythrocytes into the *in vitro* conditions, their trophicity is disturbed [22, 34]. Herewith, under low temperatures, the hydrophobic interactions are weakened [22], membrane phospholipid distribution is disrupted [16], there is a change in salt ion transport, and glucose entry into the cells [33], as well as a decrease in glycolytic enzyme activity [27] and ATP synthesis [22]. This results in a decreased activity of membrane Na, K-ATPase and Ca-ATPase [3], thereby disrupting the ion homeostasis, altering the erythrocyte shape (echinocytes, spherocytes, stomatocytes) and volume [3, 22, 32, 37, 39]. All these changes entail an increased osmotic fragility in cells and a loss of functional adequacy of erythrocytes. During hypothermic storage, the spatial structure of hemoglobin is likely disturbed in cells [39] that may result in an enhanced osmotic activity of hemoglobin, an excess water inflow to cells, and their increased hemolysis during transfusion.

Thus, the advantages of hypothermic storage of canine blood and its components include the



Ймовірно, в процесі гіпотермічного зберігання порушується також просторова структура гемоглобіну в клітинах [5], що може призводити до посилення осмотичної активності гемоглобіну, зайвому надходженню води в клітини і їх підвищеному гемолізу під час трансфузії.

Таким чином, переваги гіпотермічного зберігання крові собак та її компонентів полягають у збереженні цілісності еритроцитів за відсутності потреби в дорогому обладнанні. В той же час короткий термін зберігання за таких умов унеможливує створення банку донорської крові.

Кріоконсервування еритроцитів собак. Заможування-відігрівання без кріопротекторів істотно пошкоджує біологічні об'єкти [5, 14]. Встановлено, що кріопшкодження клітин крові безпосередньо пов'язані зі змінами агрегатного стану і фазовими переходами вмісту клітин, а також їх навколишнього водного середовища [5]. Перехід води з рідкого стану в твердий у процесі заморожування, а потім знову в рідкий під час відігріву значним чином впливає на цілісність клітин і їх вміст [5]. За відсутності у середовищі кріопротекторів формування кристалів льоду в клітинах стає неминучим. У таких умовах усі клітинні компоненти, в тому числі білки, можуть піддаватися дегідратації [18, 33], втрачаючи зв'язану воду, що є важливим елементом підтримки конформації білкових макромолекул. Тобто дегідратація та утворення кристалів льоду або твердої аморфної фази всередині й поза клітиною, та зростання кристалів — центральні пошкодуючі процеси, що відбуваються під час заморожування [5]. Крім цього, певну негативну роль відіграють перекристалізація та осмотичний стрес, що виникають під час відігріву [19, 30]. Ці фізичні процеси призводять до механічних пошкоджень, порушення проникності й цілісності мембрани, втрати вмісту клітини.

За умов повільного охолодження еритроцитів з використанням кріопротекторів, коли швидкості заморожування досить низькі ($2-3^{\circ}\text{C}/\text{хв}$), відбувається зародження, формування і зростання позаклітинних кристалів льоду за рахунок кристалізації суспендуючого розчину [5]. Під впливом осмотичних сил, які виникли за рахунок зростаючих кристалів, вміст клітини сильно зводнюється, а потім формуються і внутрішні кристали за рахунок залишків внутрішньоклітинної води. Навколо клітин відбувається також концентрування розчинів солей [26]. Ці фізичні фактори пошкоджують мембрану еритроцитів і мають несприятливий вплив на внутрішню

preservation of erythrocyte integrity with no need to use an expensive equipment. At the same time, a short storage term under these conditions renders the donor blood banking impossible.

Cryopreservation of dog erythrocytes. Cryoprotectant-free freeze-thawing causes a significant damage to biological objects [11, 38]. The cryodamage to blood cells were established as directly related to the changes in aggregate state and phase transitions of cell content, and water medium around them [39]. The water transition from a liquid state to a solid one during freezing, and then again to a liquid state during thawing, significantly affects the cell integrity and content [39]. When the medium is free of cryoprotectants, the ice crystal formation in cells is inevitable. Under these conditions, all the cell components, including proteins may get dehydrated [15, 31], by losing the bound water, which is an important element of conformation support in protein macromolecules. Namely, the dehydration, formation of either ice crystals or solid amorphous phase inside and outside a cell, as well as the crystal growth are the main damaging processes that occur during freezing [39]. In addition, the recrystallization and osmotic stress during thawing play a certain negative role [16, 28]. These physical processes lead to mechanical damage, disorder in membrane permeability and integrity, loss of cell content.

During erythrocyte slow cooling with the use of cryoprotectants, when the freezing rates are quite low ($2-3^{\circ}\text{C}/\text{min}$), the nucleation, formation and growth of extracellular ice crystals occur due to suspending solution crystallization [39]. Under the impact of osmotic forces, resulted from growing crystals, the cell content is strongly dehydrated, followed by formation of internal crystals due to intracellular water residues. The saline solutions are also concentrated around the cells [23]. These physical factors damage to erythrocyte membrane and adversely affect an internal spatial structure of hemoglobin, being the pivotal causes of erythrocyte hemolysis during thawing.

During rapid freezing with $300-400^{\circ}\text{C}/\text{min}$ rate (by immersion into liquid nitrogen) in the presence of cryoprotectants, a simultaneous crystallization (amorphization) of external preserving solution and intracellular content occurs, being less traumatic for erythrocytes [39]. At high freezing rates using appropriate cryoprotectants, the hemolysis rate after freeze-thawing is significantly reduced and makes 15–20% [8].

Thus, the cryoprotectant-free freezing of canine erythrocytes results in virtually complete cell hemo-



просторову структуру гемоглобіну. Це є основними причинами гемолізу еритроцитів під час розморожування.

У процесі швидкого заморожування зі швидкістю 300–400°C/хв (шляхом занурення в рідкий азот) в присутності кріопротекторів відбувається одночасна кристалізація (аморфізація) зовнішнього консервувального розчину і внутрішньоклітинного вмісту, що є менш травматичним для еритроцитів [5]. При високих швидкостях заморожування з використанням відповідних кріопротекторів рівень гемолізу після розморожування істотно знижується і може становити 15–20% [3].

Таким чином, заморожування еритроцитів собакам без кріопротекторів призводить до майже повного гемолізу клітин після розморожування [5]. Тільки застосування кріопротекторів дозволяє тривалий час, протягом декількох років, зберігати кров та її компоненти за температур –196...– 80°C.

Кріопротектори для кріоконсервування еритроцитів собак. Пошкодження еритроцитів собак під час заморожування можна значно зменшити, якщо дотримуватись спеціальних умов, зокрема, шляхом підбору кріопротекторів та їх концентрацій, способу їх введення та терміну інкубації клітин до заморожування, а також підбору оптимальної швидкості заморожування і відігріву. Ці заходи зводять пошкодження еритроцитів до мінімуму.

Захисну дію кріопротекторів насамперед пов'язують із запобіганням кристалізації під час зниження температури, ефективним зменшенням виходу води з клітин, розбавленням концентрації солей [14].

Кріопротектори та їх хімічна природа неоднаково ефективні для різних біологічних об'єктів. Тому для еритроцитів різних видів тварин одні й ті самі кріопротектори не завжди дієві.

Проникні кріопротектори. Основними проникними кріопротекторами є гліцерол і диметилсульфоксид (ДМСО), які досить добре проникають всередину більшості видів клітин [5]. Вони знижують точку замерзання суспензій клітин, зменшують розміри кристалів льоду, знижують точку евтектики. Крім того, запобігають зменшенню об'єму клітин і збільшенню концентрації електролітів, знижуючи температуру, за якої в процесі заморожування досягається критична концентрація солей.

Гліцерол — найефективніший кріопротектор для еритроцитів людини [5, 34], оскільки

lysis after thawing [39]. Only the use of cryoprotectants enables storing blood and its components at –196...–80°C for a long time over several years.

Cryoprotectants for dog erythrocyte cryopreservation. Damage to canine erythrocytes during freezing may be significantly mitigated if special conditions are met, particularly by selecting cryoprotectants and their concentrations, administration ways, cell incubation period prior to freezing, and by choosing the optimal rates of freezing and warming. These measures can minimize the erythrocyte damages.

A protective effect of these agents is primarily associated with the prevention of crystallization when lowering the temperature, an efficient decrease of water release out of cells, and dilution of salt concentration [11].

Cryoprotectants and their chemical nature are not equally efficient for different biological objects. Therefore, the same cryoprotectants are not always effective for erythrocytes of different animal species.

Permeable cryoprotectants. Glycerol and dimethyl sulfoxide (DMSO), penetrating quite well into most cell types are the main permeable cryoprotectants [39]. They can lower the freezing point of cell suspensions, reduce ice crystal size, and diminish the eutectic point. In addition, they prevent a decrease in cell volume and increase in electrolyte concentration, by lowering the temperature where the critical concentration of salts is reached during freezing.

Glycerol is the most efficient cryoprotectant for human erythrocytes [32, 39], as it can rapidly penetrate into the cells, and has low toxicity even at high concentrations. There are two cryopreservation techniques with glycerol use: at high (slow cooling [39]) and low (rapid cooling [26]) concentrations.

The slow cooling (40% glycerol concentration) showed quite a high efficiency (70–80% survival) for canine erythrocytes [1].

A long and complicated procedure of cryoprotectant introduction into cell suspension, which includes four stages, is the main disadvantage of this method. Furthermore, the post-thaw cryoprotectant removal out of cells is rather difficult.

The rapid cooling occurred to be inefficient for canine erythrocytes [7, 20]. It involved the use of different concentrations of cryoprotectant (5–20%) [7, 24]. The post-thaw cell survival was quite low and made 32–43% (Table). On the one hand, this



він швидко проникає у клітини і є малотоксичним навіть у високих концентраціях. Існує два методи кріоконсервування з використанням гліцеролу: з високою (повільне охолодження [5]) та низькою (швидке охолодження [28]) концентрацією.

Метод повільного охолодження (концентрація гліцеролу — 40%) для еритроцитів собак показав досить високу його ефективність (збереження — 70–80%) [7].

Основним недоліком цього методу є тривала та складна процедура введення кріопротектора в суспензію клітин, яка включає в себе чотири етапи. Крім того, складним є видалення кріопротектора з клітин після розморожування.

Метод швидкого охолодження виявився не ефективним для еритроцитів собак [2, 23]. Для цього методу використовувалися різні концентрації кріопротектора (5–20%) [2, 6]. Збереження клітин після розморожування було досить низьким і становило 32–43% (таблиця). З одного боку, це пов'язано з дуже повільною проникністю гліцеролу шляхом полегшеної дифузії в клітини [4, 23], з іншого — до пошкодження клітин може призвести процедура дегліцеринізації, у результаті якої виникає гіпотонічний стрес. Таким чином, різке додавання розчину гіпертонічного кріопротектора та подальше його видалення призводить до зміни осмотичної стійкості клітин і зниження їх збереженості.

Іншим проникним кріопротектором є ДМСО. У роботах О.Н. Денисової та співат. [2], Liu J. та співат. [23] експериментально встановлено, що ДМСО виявився більш придатним для кріоконсервування еритроцитів собак порівняно з гліцеролом (таблиця). Збереження еритроцитів після заморожування-відігрівання з 10% ДМСО складало 75–80%. Еритроцити, кріоконсервовані з ДМСО, після розморожування і відмивання кріопротектора зберігають високу стійкість у фізіологічних умовах із підтриманням нормальної форми і осмотичної крихкості. Відомо, що коефіцієнт проникності для ДМСО крізь мембрану еритроцитів собак значно вищий, ніж для гліцеролу [4]. Високі показники виживання еритроцитів собак за умов кріоконсервування з ДМСО можуть бути пов'язані з надходженням максимальної кількості кріопротектора до еритроцитів. Більш швидке проникнення ДМСО в еритроцити зменшує ймовірність пошкодження гіпертонічним стресом. Через можливу токсичну дію на тварин рекомендується якомога ретельніше видалити ДМСО з клітин [5, 16], що ускладнює процедуру підготовки клітин до трансфузії.

Збереження еритроцитів собаки після заморожування-відігріву в залежності від використаного кріопротектора під час швидкого заморожування [3, 28]

Post-thaw canine erythrocyte preservation rate depending on the cryoprotectant used at a rapid freezing [8, 26]

| Кріопротектор Cryoprotectant | Кінцева концентрація, % Final concentration, % | Збереження, % Preservation rate, % |
|-----------------------------------|---|---------------------------------------|
| Гліцерол Glycerol | 15 | 30–40 |
| ДМСО DMSO | 10 | 75–80 |
| ПЕГ-1500 PEG-1500 | 15 | 90–95 |
| ГЕК HES | 17,5 | 85–95 |
| ДМСО + Сахароза DMSO + Sucrose | 10 + 2 | 80–90 |

was due to the very slow glycerol permeability via facilitated diffusion into the cells [20, 38], on the other hand, the deglycerolization might cause the cell damage, resulting in hypotonic stress. Thus, a sharp supplement of hypertonic cryoprotectant solution and its subsequent removal led to a change in cell osmotic resistance and a decrease in cell survival.

Another permeable cryoprotective agent is DMSO. O.N. Denisova *et al.* [7], Liu J *et al.* [20] have experimentally found that DMSO occurred to be more suitable for canine erythrocyte cryopreservation as compared with glycerol (Table). The erythrocyte survival after freeze-thawing with 10% DMSO was 75–80%. The erythrocytes, cryopreserved with DMSO, after thawing and washing from cryoprotectant, preserved a high stability under physiological conditions with maintenance of normal shape and osmotic fragility. It is known that the permeability coefficient through canine erythrocyte membrane is much higher for DMSO vs. glycerol [38]. High survival rates of canine erythrocytes under cryopreservation with DMSO may be associated with the entry of the maximum amount of cryoprotectant into erythrocytes. More rapid DMSO penetration into erythrocytes reduces the probability of damages induced by hypertonic stress. Because of a possible toxic effect on animals, it is recommended to remove DMSO from cells as thoroughly as possible [13, 39], which makes it difficult to prepare cells for transfusion.

Impermeable cryoprotectants. Due to the fact that cryoprotectant removal significantly complicates the preparation for transfusion, the cryo-



Непроникні кріопротектори. У зв'язку з тим, що видалення кріопротектора значно ускладнює процедуру підготовки до трансфузії, активно розробляються технології кріоконсервування з використанням непроникних кріопротекторів. Через низьку токсичність деякі непроникні кріопротектори в невеликих кількостях можуть бути внесені в кров'яне русло реципієнта в процесі трансфузії деконсервованої крові. Головною перевагою методів кріоконсервування еритроцитів з непроникними кріопротекторами є можливість виключення етапу їх відмивання перед трансфузією [22, 28].

Найбільш ефективними непроникними кріопротекторами для кріоконсервування еритроцитів собак є поліетиленгліколь з м. м. 1500 (ПЕГ-1500) [1, 2] та гідроксиетильований крохмаль (ГЕК) [15, 21, 28, 31]. Ці речовини ефективні в низьких концентраціях і забезпечують захист клітин за допомогою часткової їх дегідратації перед заморожуванням. Ці кріопротектори знижують інтенсивність формування внутрішньоклітинних кристалів льоду і за умов високих швидкостей охолодження суспензії клітин замерзають ще до досягнення критичного рівня концентрації розчинів солей.

Під час використання ПЕГ-1500 у якості кріопротектора для еритроцитів собак [2] досягається високий рівень збереження клітин після циклу заморожування-відігріву. Виживання клітин після розморожування становить до 95% (таблиця).

Однак під час оцінки основних параметрів деконсервованих еритроцитів після перенесення їх в ізотонічне середовище виявлено значні порушення механо-еластичних властивостей і підвищення крихкості еритроцитів [2]. Це підтверджується результатами дослідження K. Singbartl та співавт. [30] (28), проведеними на еритроцитах людини.

Гідроксиетильований крохмаль з м. м. 200 у концентрації 25–35% також застосовують для захисту еритроцитів собак від низькотемпературних пошкоджень [21, 28, 32]. Заморожування здійснюють зануренням контейнерів у рідкий азот (–196°C). При цьому після розморожування залишається до 80% збережених клітин. Використання непроникного кріопротектора ГЕК для захисту еритроцитів собак від дії несприятливих факторів низькотемпературного зберігання показує зручність його застосування, оскільки він не потребує видалення перед трансфузією, але після кріоконсервування спостерігається підвищення осмотичної крихкості клітин.

Відомо, що непроникні кріопротектори можуть контактувати з поверхнею клітинних мем-

preservation technologies, involving the impermeable cryoprotectants are being actively developed. Because of their low toxicity, some impermeable cryoprotectants may be introduced into recipient's bloodstream in small amounts during transfusion of frozen-thawed blood. The main advantage of erythrocyte cryopreservation techniques using impermeable cryoprotectants is the possibility to eliminate the stage of their washing out prior to transfusion [19, 26].

The most efficient impermeable cryoprotectants for canine erythrocyte cryopreservation are polyethylene glycol with MW 1500 (PEG-1500) [2, 7] and hydroxyethyl starch (HES) [12, 18, 26, 29]. These substances are effective in low concentrations and protect cells via their partial dehydration before freezing. These cryoprotectants mitigate the intensity of intracellular ice crystal formation, and under high cooling rates, the cell suspensions are frozen even before the critical concentration of salt solutions is reached.

When using PEG-1500 as a cryoprotectant for canine erythrocytes [7], a high rate of cell integrity is achieved after freeze-thawing cycle. Cell survival after thawing is up to 95% (Table).

However, when assessing the main parameters of frozen-thawed erythrocytes after transferring them into an isotonic medium, the significant disorders of mechanical and elastic properties and increased fragility of erythrocytes were found [7]. This is confirmed by the findings of K. Singbartl *et al.* [28], obtained in human erythrocytes.

Hydroxyethyl starch with MW 200 in a concentration of 25–35% is also applied for canine erythrocyte protection against low-temperature damage [18, 26, 30]. Freezing is carried out by immersing containers into liquid nitrogen (–196°C). Herewith, up to 80% of cells are survived after thawing. The application of an impermeable cryoprotectant HES to protect canine erythrocytes against the adverse effects of low-temperature storage shows its convenience to use, because it does not need to be removed prior to transfusion, though an increased post-cryo cell osmotic fragility is observed.

It is known that impermeable cryoprotectants are able to contact a cell membrane surface and their lipid components due to hydrophobic interactions [8]. The polar ones may be altered in the presence of these substances due to penetration and incorporation of these molecules into membrane bilayer. This may induce conformational disorders of membrane-cytoskeletal complex, resulting in the defects, appeared during cell transfer into physiological conditions. This evidences a hidden



бран та їх ліпідними компонентами за рахунок гідрофобних взаємодій [3]. Полярні взаємодії в присутності цих речовин можуть змінюватися внаслідок проникнення та вбудовування цих молекул у мембранний бішар. Це може викликати конформаційні порушення мембрано-цитоскелетного комплексу, що призводить до виникнення дефектів під час перенесення клітин до фізіологічних умов. Це свідчить про прихований характер порушень і відображає нездатність білків мембрано-цитоскелетного комплексу підтримувати цілісність клітин [3, 30].

Комбіновані кріоконсерванти. Одним з наявних підходів до зниження пошкодження клітин під час кріоконсервування є застосування декількох кріопротекторів різного механізму дії. Такі розчини використовуються для кріоконсервування еритроцитів і тромбоцитів [5], кровотвірних клітин печінки [27] людини. У роботі О.М. Денисової та співавт. [3] показано достатньо високу ефективність використання комбінованих кріоконсервантів, які містять ДМСО та сахарозу, при швидкому заморожуванні еритроцитів собак. Сахароза є непроникним природним кріопротектором, яка стабілізує та захищає клітинні мембрани та білки під час заморожування [5]. Невідновлювальні дисахариди (трегалоза та сахароза) мають вищі температури склування порівняно з ДМСО, етиленгліколем та 1,2-пропандіолом. Ця властивість забезпечує утворення однорідної структури льоду з високою в'язкістю і низькою рухливістю, що призводить до зниження пошкодження клітин під час швидкого заморожування [27]. Але точний механізм дії дисахаридів на виживання клітин після відігріву залишається досі невизначеним. Оскільки в клітинах ссавців немає специфічних транспортерів для дисахаридів, то при додаванні кріопротекторів вони залишаються в позаклітинному просторі. Тому їх кріопротекторна дія недостатня для забезпечення збереження структурно-функціональної цілостності клітин. При цьому застосування дисахаридів з проникними кріопротекторами може значно покращити результат кріоконсервування. Додавання до проникного кріопротектора непроникної речовини призводить до зниження рівня пошкодження клітин у результаті послаблення гіпертонічного стресу і негативного осмотичного ефекту після видалення кріопротектора. Це перспективний напрямок пошуку ефективних кріопротекторів для збереження еритроцитів собак під час кріоконсервування, який потребує подальшого розвитку.

nature of the disorders and reflects the inability of the membrane-cytoskeletal complex proteins to maintain cell integrity [8, 28].

Combined cryopreservatives. The application of several cryoprotectants with different action modes is among the current approaches to mitigate the cell damage during cryopreservation. These solutions are used to cryopreserve human erythrocytes and platelets [39], liver hematopoietic cells [25]. O.M. Denisova *et al.* [8] showed quite a high efficiency of combined cryopreservatives, comprising DMSO and sucrose in rapid freezing for canine erythrocytes. Sucrose is an impermeable natural cryoprotectant that stabilizes and protects cell membranes and proteins during freezing [39]. Non-reducing disaccharides (trehalose and sucrose) have higher glass transition temperatures if compared with DMSO, ethylene glycol and 1,2-propanediol. This property ensures the formation of homogeneous ice structure with high viscosity and low mobility, resulting in a decreased cell damage during rapid freezing [25]. But the exact mechanism of disaccharide effect on post-thaw cell survival has still remained unclear. Since there are no specific transporters for disaccharides in mammalian cells, they stay in an extracellular space during cryoprotectant supplement. Therefore, their cryoprotective effect is insufficient to preserve the structural and functional cell integrity. Herewith the use of disaccharides with permeable cryoprotectants may significantly improve the cryopreservation outcome. The supplement of impermeable substance to permeable cryoprotectant entails a decrease in cell damage rate, resulting from weakening of hypertonic stress and negative osmotic effect after cryoprotectant removal. This trend in finding the efficient cryoprotective agents to preserve canine erythrocyte integrity during cryopreservation shows promise, but requires further development.

Currently, the blood components are being increasingly used for blood transfusion in a combined therapy of various diseases in veterinary medicine. Therefore, the improving and designing the novel methods for erythrocyte long-term low temperature storage are topical in veterinary medicine, being the urgent trends for transfusion veterinary medicine development. Damage mechanisms to canine erythrocytes, associated with the long-term low temperature storage, have remained poorly studied. So far, there are no optimal protocols for cryopreservation of whole blood or its components. Therefore, further investigations are needed to elucidate the causes of cell damage, search



Зараз у ветеринарній медицині для переливання крові все частіше використовують компоненти крові для комплексного лікування різних захворювань. Тому вдосконалення і створення нових методів довгострокового низькотемпературного зберігання еритроцитів має велике значення для ветеринарії і є актуальним напрямком розвитку трансфузійної ветеринарної медицини. Механізми пошкодження еритроцитів собак, пов'язані з тривалим низькотемпературним зберіганням, вивчені недостатньо. Поки що немає оптимальних протоколів кріоконсервування цільної крові або її компонентів. Тому потрібні подальші дослідження причин пошкодження клітин, пошуки ефективних кріопротекторів та удосконалення способів кріоконсервування компонентів крові.

Висновки

Таким чином, огляд літератури показав, що наявні методи кріоконсервування та довготривалого зберігання цільної крові собак та її компонентів ще недосконалі та потребують подальших досліджень.

1. Методи гіпотермічного зберігання крові забезпечують її збереженість лише до 20 діб, що не сприяє створенню банків довготривалого зберігання крові.

2. Методи збереження зразків крові за умов гіпотермії або кріоконсервування під захистом гліцеролу / ГЕК не задовольняють потреби в крові під час комплексного лікування собак.

3. Для вирішення проблеми довготривалого зберігання еритроцитів за умов низькотемпературного консервування перспективним є використання комбінованого кріоконсерванта, до складу якого входять ДМСО і сахароза.

Література

1. Бабийчук ЛА, Землянских НГ. Оптимизация и преимущества безотмывочного метода кріоконсервирования с ПЕО-1500. Проблемы кріобиологии. 2001; (1): 35–41.
2. Денисова ОН, Жегунов ГФ, Бабийчук ЛА. Кріоконсервирование эритроцитов животных под защитой диметилсульфоксида, полиэтиленгликоля и глицерина. Проблемы кріобиологии. 2005; 15 (2): 196–201.
3. Денисова ОМ, Жегунов ГФ. Кріоконсервирование эритроцитов собак из использованием диметилсульфоксида, полиэтиленгликоля та сахарози. Проблемы кріобиологии і кріомедицини. 2021; 31(1): 38–50.
4. Жегунов ГФ, Денисова ОН. Проницаемость эритроцитов млекопитающих для молекул глицерина и ДМСО и степень

for efficient cryoprotectants, and improve the cryopreservation techniques for blood components.

Conclusions

Thus, this review showed the available techniques for cryopreservation and long-term storage of canine whole blood and its components as not perfect yet and in need of further investigation.

1. Blood hypothermic storage ensures the preservation for up to 20 days only, making the establishing of blood banks for its long-term storage impossible.

2. Methods for blood sample storage either under hypothermia or cryopreservation with glycerol / HES protection do not satisfy the need for blood during combined therapy in dogs.

3. The use of the combined cryopreservative, which includes DMSO and sucrose is promising

References

1. Aktaran BD, Özcan M. The effects of freezing on long-term storage of canine erythrocytes. Pol J Vet Sci. 2016; 19 (2): 401–6.
2. Babiychuk LA, Zemlianskykh NG. Optimization and advantages of washing-out method of erythrocyte cryopreservation with PEO-1500. Problems of Cryobiology. 2001; (1): 35–41.
3. Banerjee T, Kuypers FA. Reactive oxygen species and phosphatidylserine externalization in murine sickle red cells. Br J Haematol. 2004; 124 (3): 391–402.
4. Burger SR. Handbook of transfusion medicine. San Diego: Academic Press; 2001. 171 p.
5. Cotter SM. Advances in veterinary science and comparative medicine: comparative transfusion medicine. San Diego: Academic Press; 1991. 343 p.
6. D'Alessandro A, Gray AD, Szczepiorkowski ZM, et al. Red blood cell metabolic responses to refrigerated storage, rejuvenation, and frozen storage. Transfusion. 2017; 57: 1019–30.
7. Denisova ON, Zhegunov GF, Babiychuk LA. Cryopreservation of animal's erythrocytes under dimethyl sulfoxide, polyethylene oxide and glycerol protection. Problems of Cryobiology. 2005; 15 (2): 195–201.
8. Denysova OM, Zhegunov GF. Cryopreservation of canine erythrocytes using dimethyl sulfoxide, polyethylene glycol and sucrose. Probl Cryobiol Cryomed. 2021; 31(1): 38–50.
9. Dodds WJ. Update on animal blood banking services. Veterinary Practice Staff. 1993; 5 (2): 2–7.
10. 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.
11. Fuller BJ, Lane N, Benson EE, editors. Life in the frozen state. Boca Raton: CRC Press; 2004. 672 p.
12. Hon M, Thomovsky EJ, Brooks AC, Johnson PA. Cryopreservation of feline red blood cells in liquid nitrogen using glycerol and hydroxyethyl starch. J Feline Med Surg. 2020; 22 (4): 366–75.
13. Gordelyi VI, Kiselev MA, Lesieur P, et al. Lipid membrane structure and interactions in dimethyl sulfoxide water mixtures. Biophys J. 1998; 75: 2343–51



- сохранности после замораживания-оттаивания. Доповіді національної академії наук України. 2010; 12: 139–43.
5. Жегунов ГФ, Нардид ОА, редакторы. Основы криобиологии и криомедицины. Харьков: Бровин АВ; 2019. 616 с.
 6. Первушина ОА, Жегунов ГФ, Денисова ОН. Влияние замораживания-отогрева на сохранность эритроцитов животных-компаньонов. Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина. 2014; 6 (35): 36–9.
 7. Aktaran BD, Özcan M. The effects of freezing on long-term storage of canine erythrocytes. *Pol J Vet Sci.* 2016; 19 (2): 401–6.
 8. Banerjee T, Kuypers FA. Reactive oxygen species and phosphatidylserine externalization in murine sickle red cells. *Br J Haematol.* 2004; 124 (3): 391–402.
 9. Burger SR. *Handbook of transfusion medicine.* San Diego: Academic Press; 2001; 171 p.
 10. Cotter SM. *Advances in veterinary science and comparative medicine: comparative transfusion medicine.* San Diego: Academic Press; 1991. 343 p.
 11. D'Alessandro A, Gray AD, Szczepiorkowski ZM, et al. Red blood cell metabolic responses to refrigerated storage, rejuvenation, and frozen storage. *Transfusion* 2017; 57: 1019–30.
 12. Dods WJ. Update on animal blood banking services. *Veterinary Practice Staff.* 1993; 5 (2): 2–7.
 13. 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.
 14. Fuller BJ, Lane N, Benson EE, editors. *Life in the frozen state.* Boca Raton : CRC Press; 2004. 672 p.
 15. Hon M, Thomovsky EJ, Brooks AC, Johnson PA. Cryopreservation of feline red blood cells in liquid nitrogen using glycerol and hydroxyethyl starch. *J Feline Med Surg.* 2020; 22 (4): 366–75.
 16. Gordel'iy VI, Kiselev MA, Lesieur P, et al. Lipid membrane structure and interactions in dimethyl sulfoxide water mixtures. *Biophys J.* 1998; 75: 2343–51.
 17. Guerra-Shinohara EM, Barretto OC. The erythrocyte cytoskeleton protein 4.2 is not demonstrable in several mammalian species. *Braz J Med Biol Res.* 1999; 32 (6): 683–7.
 18. Ishiguro H, Rubinsky B. Mechanical interactions between ice crystals and red blood cells during directional solidification. *Cryobiology.* 1994; 31 (5): 483–500.
 19. Kangur L, Timpmann K, Freiberg A. Stability of integral membrane proteins under high hydrostatic pressure: the LH2 and LH3 antenna pigment-protein complexes from photosynthetic bacteria. *J Phys Chem.* 2008; 112 (26): 7948–55.
 20. Kanas T, Acker JP. Biopreservation of red blood cells – the struggle with hemoglobin oxidation. *FEBS J* 2010; 277: 343–56.
 21. 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.
 22. 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. German.
 23. Liu J, Christian JA, Critser JK. Canine RBC osmotic tolerance and membrane permeability. *Cryobiology.* 2002; 44 (3): 258–68.
 24. Morrison JA, Lauer SK, Baldwin CJ, et al. Evaluation of the use of subcutaneous implantable vascular access ports in feline blood donors. *J Am Vet Med Assoc.* 2007; 230 (6): 855–61
 25. Obrador R, Musulin S, Hansen B. Red blood cell storage lesion. *J Vet Emerg Crit Care.* 2015; 25(2): 187–99.
 26. Guerra-Shinohara EM, Barretto OC. The erythrocyte cytoskeleton protein 4.2 is not demonstrable in several mammalian species. *Braz J Med Biol Res.* 1999; 32 (6): 683–7.
 27. Ishiguro H, Rubinsky B. Mechanical interactions between ice crystals and red blood cells during directional solidification. *Cryobiology.* 1994; 31 (5): 483–500.
 28. Kangur L, Timpmann K, Freiberg A. Stability of integral membrane proteins under high hydrostatic pressure: the LH2 and LH3 antenna pigment-protein complexes from photosynthetic bacteria. *J Phys Chem.* 2008; 112 (26): 7948–55.
 29. Kanas T, Acker JP. Biopreservation of red blood cells - the struggle with hemoglobin oxidation. *FEBS J.* 2010; 277: 343–56.
 30. 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.
 31. 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. German.
 32. Liu J, Christian JA, Critser JK. Canine RBC osmotic tolerance and membrane permeability. *Cryobiology.* 2002; 44 (3): 258–68.
 33. Morrison JA, Lauer SK, Baldwin CJ, et al. Evaluation of the use of subcutaneous implantable vascular access ports in feline blood donors. *J Am Vet Med Assoc.* 2007; 230 (6): 855–61
 34. Obrador R, Musulin S, Hansen B. Red blood cell storage lesion. *J Vet Emerg Crit Care.* 2015; 25(2): 187–99.
 35. Guerra-Shinohara EM, Barretto OC. The erythrocyte cytoskeleton protein 4.2 is not demonstrable in several mammalian species. *Braz J Med Biol Res.* 1999; 32 (6): 683–7.
 36. Ishiguro H, Rubinsky B. Mechanical interactions between ice crystals and red blood cells during directional solidification. *Cryobiology.* 1994; 31 (5): 483–500.
 37. Kangur L, Timpmann K, Freiberg A. Stability of integral membrane proteins under high hydrostatic pressure: the LH2 and LH3 antenna pigment-protein complexes from photosynthetic bacteria. *J Phys Chem.* 2008; 112 (26): 7948–55.
 38. Kanas T, Acker JP. Biopreservation of red blood cells - the struggle with hemoglobin oxidation. *FEBS J.* 2010; 277: 343–56.
 39. 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.
 40. 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. German.
 41. Liu J, Christian JA, Critser JK. Canine RBC osmotic tolerance and membrane permeability. *Cryobiology.* 2002; 44 (3): 258–68.
 42. Morrison JA, Lauer SK, Baldwin CJ, et al. Evaluation of the use of subcutaneous implantable vascular access ports in feline blood donors. *J Am Vet Med Assoc.* 2007; 230 (6): 855–61
 43. Obrador R, Musulin S, Hansen B. Red blood cell storage lesion. *J Vet Emerg Crit Care.* 2015; 25(2): 187–99.
 44. Guerra-Shinohara EM, Barretto OC. The erythrocyte cytoskeleton protein 4.2 is not demonstrable in several mammalian species. *Braz J Med Biol Res.* 1999; 32 (6): 683–7.
 45. Ishiguro H, Rubinsky B. Mechanical interactions between ice crystals and red blood cells during directional solidification. *Cryobiology.* 1994; 31 (5): 483–500.
 46. Kangur L, Timpmann K, Freiberg A. Stability of integral membrane proteins under high hydrostatic pressure: the LH2 and LH3 antenna pigment-protein complexes from photosynthetic bacteria. *J Phys Chem.* 2008; 112 (26): 7948–55.
 47. Kanas T, Acker JP. Biopreservation of red blood cells - the struggle with hemoglobin oxidation. *FEBS J.* 2010; 277: 343–56.
 48. 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.
 49. 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. German.
 50. Liu J, Christian JA, Critser JK. Canine RBC osmotic tolerance and membrane permeability. *Cryobiology.* 2002; 44 (3): 258–68.
 51. Morrison JA, Lauer SK, Baldwin CJ, et al. Evaluation of the use of subcutaneous implantable vascular access ports in feline blood donors. *J Am Vet Med Assoc.* 2007; 230 (6): 855–61
 52. Obrador R, Musulin S, Hansen B. Red blood cell storage lesion. *J Vet Emerg Crit Care.* 2015; 25(2): 187–99.



26. Pegg DE, Diaper MP. The effect of initial tonicity on freeze/thaw injury to human red cells suspended in solutions of sodium chloride. *Cryobiology*. 1991; 28 (1): 18–35.
27. Petrenko YA, Jones DR, Petrenko A.Y. Cryopreservation of human fetal liver hematopoietic stem/progenitor cells using sucrose as an additive to the cryoprotective medium. *Cryobiology*. 2008; 57 (3):195–200.
28. 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>
29. 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.
30. Seki S, Mazur P. Kinetics and activation energy of recrystallization of intracellular ice in mouse oocytes subjected to interrupted rapid cooling. *Cryobiology*. 2008; 56 (3): 171–80.
31. Singbartl K, Langer R, Henrich A. Altered membrane skeleton of hydroxyethylstarch-cryopreserved human erythrocytes. *Cryobiology*. 1998; 36 (2): 115–23.
32. Sputteck A, Langer R, Singbartl G. Cryopreservation of red blood cells with the non-penetrating cryoprotectant hydroxyethyl starch. *CryoLetters*. 1995; 16 (4): 283–8.
33. Strambini GB, Gonnelli M. Protein stability in ice. *Biophys J*. 2007; 92 (6): 2131–8.
34. Valeri CR. Status report on the quality of liquid and frozen red blood cells. *Vox Sang*. 2002; 83 (1): 193–6.
35. Verma M, Kiran D, Deepika M, et al. Effect of blood storage on complete biochemistry. *J Blood Disord Transfus*. [Internet]. 2015 Dec 31 [cited 2020 May 10]; 6(6): 329. Available from: <https://www.walshmedicalmedia.com/open-access/effect-of-blood-storage-on-complete-biochemistry-2155-9864-1000329.pdf>
36. Wardrop KJ. Selection of anticoagulant-preservatives for canine and feline blood storage. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 1995; 25(6): 1263–76.
37. Wardrop KJ, Tucker RL, Mugnai KN. Evaluation of canine red blood cells stored in a saline, adenine, and glucose solution for 35 days. *J Vet Intern Med*. 1997;11(1): 5–8
38. Yurkovich JT, Zielinski DC, Yang L, et al. Quantitative time-course metabolomics in human red blood cells reveal the temperature dependence of human metabolic networks. *J Biol Chem* 2017; 292: 19556–64.
39. Zehnder L, Schulzki T, Goede JS, et al. Erythrocyte storage in hypertonic (SAGM) or isotonic (PAGGSM) conservation medium: influence on cell properties. *Vox Sang*. 2008; 95 (4): 280–7.
34. Wardrop KJ. Selection of anticoagulant-preservatives for canine and feline blood storage. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 1995; 25(6): 1263–76.
35. Wardrop KJ, Tucker RL, Mugnai KN. Evaluation of canine red blood cells stored in a saline, adenine, and glucose solution for 35 days. *J Vet Intern Med*. 1997;11(1):5–8.
36. Yurkovich JT, Zielinski DC, Yang L, et al. Quantitative time-course metabolomics in human red blood cells reveal the temperature dependence of human metabolic networks. *J Biol Chem* 2017; 292: 19556–64.
37. Zehnder L, Schulzki T, Goede JS, et al. Erythrocyte storage in hypertonic (SAGM) or isotonic (PAGGSM) conservation medium: influence on cell properties. *Vox Sang*. 2008; 95 (4):280–7.
38. Zhegunov GF, Denisova ON. [Permeability of mammalian erythrocytes for the molecules of glycerol and DMSO and the level of cellular viability after freeze-thawing.] *Dopov Nac akad nauk Ukr*. 2010; 12: 139–43. Russian.
39. Zhegunov GF, Nardid OA, editors. [Basics of cryobiology and cryomedicine.] Kharkiv: Brovin AB; 2019. 616 p. Russian.