



**Рис. 3.** Рентгенограма хворої кінцівки:

А – Під час первинного дослідження. Проекція знімку не дозволяє встановити наявності морфоструктурних змін кістки. Б – Після здійснення додаткової рентгенографії. Добре виражені відлом та вогнища запалення окістя плюсневої кістки.

Лікувальні заходи корегувалися з урахуванням клінічних показників та перебігу. На 35-40 добу ознаки плантарної флексії майже зникли. На цей час кінь знаходиться під наглядом фахівців ветеринарної медицини.

#### Висновки

1. Результати досліджень свідчать, що діагностика захворювань локомоторного апарату у коней є достатньо складною і потребує різних ретельних, як клінічних, так й спеціальних методів досліджень.

2. Достовірна діагностика захворювання кінцівки коня, у даному випадку, була досягнута завдяки проведенню рентгенографії в двох проекціях, що дозволило виявити періостальну реакцію і відлам кістки.

3. Лікування коней з травматичними пошкодженнями локомоторного апарату з урахуванням їх клінічних форм прояву, анатомо-фізіологічної будови та функції повинні здійснюватися згідно достовірного діагнозу.

#### References

- Batrakov, A. JA., & Zaharov, P. G. (2000). Prichiny boleznej sustavov u krupnogo rogatogo skota. *Veterinarija*, 2, 10-15 (in Russian).
- Izdeps'kij, V. J., & Zamazij, A. A. (2002). Dejaki pitannya patogenezu ta patogenetichni metodi likuvannja asepticnih artrit u konej. *Nauk. praci Poltav. derzh. agrar. akad. Veterinarni nauki*, 2(21), 318-321 (in Ukrainian).
- Procenko, A. A. & SHeremet, S. I. (1990). Lechenie asepticheskikh vospalitel'nyh processov oporno-dvigatel'nogo apparata u sportivnyh loshadej. *Sovershenstvovanie hozjajstvennogo mehanizma i intensifikacija agropromyshlennogo proizvodstva*, 2, 178-180 (in Russian).
- Stoc'kij, O. G., & Lazorenko, A. B. (2004). Rozpovsjudzhennja ta struktura hirurgichnoї patologії u konej. *Visnik Poltav. derzh. agrar. Akad.*, 1, 17-20 (in Ukrainian).
- Rose, R. J. (1983). The diagnosis and treatment of arthritis in horses. *Veterinary Journal*, 31(1-2), 13-15.

UDC: 636.36:611.018.51:542.455

doi: 10.31890/vtpp.2018.02.18

## THE METHODS OF CRYOPRESERVATION OF RED BLOOD CELLS OF ANIMAL

**O. M. Denysova, T. I. Yakymenko, B. B. Vashenko, G. P. Zhegunov, V. O. Prichodchenko, N. I. Gladka**  
*Kharkiv State Zooveterinary Academy, Kharkiv, Ukraine*  
*Academichna str., 1, Mala Danylivka, Dergachi district, Kharkiv region, 62341*  
*E-mail: [denisova78@yahoo.com](mailto:denisova78@yahoo.com)*

Nowadays, the method of blood transfusion is often used in veterinary practice. Hypothermic storage allows to save blood cells for a limited time, while morphofunctional parameters are getting worse. Cryopreservation allows to save and receive high-quality cells for the use in veterinary practice. Therefore, the development of reserves of donor blood is possible with long-term preservation in the frozen state. The use of cryopreservation makes it possible to avoid a number of problems: finding a donor at the right time for transfusion, the cost of maintaining the donor, etc. These days high therapeutic efficacy of using

cryopreserved red blood cells was confirmed in intensive therapy and hematological diseases.

The survival of biological objects under cryopreservation conditions is due to the ability of cells to withstand a complex of negative factors, including: the formation of crystals, an increase in the concentration of salts and osmotic pressure, dehydration of macromolecules and phase transitions of membrane lipids. Fundamental studies of physicochemical processes in cell suspensions under cooling and freezing conditions revealed important patterns that determine the basic principles of damage

and protection of biological objects. The safety of cells under the influence of factors of low-temperature exposure is ensured by the use of special agents - cryoprotectants. Cryoprotective agents belong to different classes of organic compounds and are able to protect cells according to endo-and exocellular principle. However, the high efficiency of cryopreservation of red blood cells is achieved mainly by using endocellular compounds which must be removed after thawing from cell suspensions in order to maintain osmotic stability of cells under physiological conditions. Alternative to this may be cell-free cell cryopreservation methods developed on the basis of exocellular cryoprotectants. It should be noted that the

cryoprotective properties of different compounds selectively manifest themselves depending on the type of cells.

Biological preservation of erythrocytes for the use in veterinary practice is based on technologies for achieving biological stability and, accordingly, preserving a viable state after prolonged storage. This article reviews the mechanisms of cryodamage of erythrocytes, the cryoprotectants used in cryopreservation, as well as the existing low temperature storage methods.

**Key words:** red blood cells of animals, cryopreservation, cryoprotectant, transfusion.

## СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО МЕТОДИ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ЕРИТРОЦИТІВ ТВАРИН

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

Харківська державна зооветеринарна академія, Харків, Україна  
вул. Академічна, 1, смт. Мала Данилівка, Дергачівський район, Харківська обл., 62341.  
E-mail: [denisova78@yahoo.com](mailto:denisova78@yahoo.com)

Кріоконсервування еритроцитів тварин дозволяє зберігати та отримувати якісні клітини для використання в ветеринарній практиці. В статті представлено огляд літератури стосовно кріопошкоджень при низькотемпературному впливі, кріопротекторів, які використовуються при зберіганні клітин у рідкому азоті, а також існуючим методам кріоконсервування.

**Ключові слова:** еритроцити тварин, кріоконсервування, кріопротектори, трансфузія

Кріоконсервування – це процес збереження біологічних структур і функцій живих систем за допомогою заморожування і зберігання при ультранизких температурах. Нижче  $-150^{\circ}\text{C}$  біологічно значимі реакції і зміни фізико-хімічних властивостей у живих системах відсутні. Фізіологія еритроцита при кріоконсервуванні, включаючи структуру гемоглобіну і мембрани, енергетичний потенціал клітини залишається в незмінному стані. Кріоконсервування еритроцитів є технологією, що дозволяє забезпечувати біологічні функції *ex vivo* і зберігати клітини тривалий час.

На даний момент довгострокове зберігання еритроцитів тварин є менш розробленою проблемою, ніж зберігання еритроцитів людини, хоча розвиток ветеринарії створює передумови для впровадження цієї технології (Feldman, & Kristensen, 1995; Kaufman, 1992; Obrador, Musulin, Hansen, 2015). Часто виникають ситуації необхідності проведення гемотрансфузії для хворої тварини, зокрема, при гострій втраті крові, різної етіології анеміях, тромбоцитопенії і інших. Гемотрансфузія є високоефективним методом інтенсивної терапії, незамінним методом лікування при важких формах бабезіозу, важких інфекційних захворюваннях, таких як чума і інфекційний ентерит. Тому на даний момент інтерес до кріоконсервування еритроцитів тварин зростає дедалі більше.

Еритроцити ссавців мають свої особливості: як структурні – будова мембранно-цитоскелетного комплексу, фосfolіпідного складу мембрани, так і регуляції іонного гомеостазу (Agar, & Board, 1983). Зокрема, в мембрані еритроцитів коня відсутні деякі білки цитоскелету (білок смуги 4.2), еритроцити бика мають особливості ліпідного складу мембран (високий рівень сфінгомеліну). Особливістю еритроцитів собаки є відмінна від еритроцитів людини концентрація іонів зовні і всередині клітин (велика концентрація іонів натрію в клітинах). Це

багато в чому визначає їх різну реакцію на дію кріопротекторів і на процес кріоконсервування. Тому для еритроцитів кожного виду тварин необхідно розробляти свої технології кріоконсервування. Розвиток таких технологій дасть можливість створити банки крові тварин і завжди мати запас кріоконсервованих клітин. З іншого боку, вивчення реакції клітин на дію чинників низькотемпературної дії дасть можливість зрозуміти загальнобіологічні закономірності їх поведінки в стресових умовах.

Кріопошкодження еритроцитів. Вивчення пошкоджень клітин, що виникають при низькотемпературній дії, а також механізмів захисту клітин кріопротекторами грає центральну роль в розвитку методів кріоконсервування еритроцитів для клінічних і дослідницьких цілей. В даний час для пояснення процесів, що відбуваються при заморожуванні еритроцитів керуються двофакторною теорією (Mazur, Leibo, & Chu, 1972). Згідно з нею при повільному охолодженні відбувається формування позаклітинних кристалів льоду і відбувається дегідратація еритроцитів, що призводить до зменшення об'єму клітини. Ці фізичні процеси призводять до кріопошкоджень: "ефект упаковки" (механічні пошкодження), порушення проникності мембрани, втрата іонів. При швидкому заморожуванні виникає токсична дія розчинів (біохімічні пошкодження) і внутрішньоклітинне виникнення кристалів льоду (механічне пошкодження).

При заморожуванні еритроцитів у фізіологічних умовах відбувається замерзання позаклітинної води, в результаті збільшується концентрація розчинів незамороженої фракції. При подальшому охолодженні формуються кристали позаклітинного льоду, що призводить до значної дегідратації клітин. Якщо швидкість охолодження повільна, то рух води через мембрану буде підтримувати хімічну рівновагу. Таким чином, при

повільній швидкості охолодження відбувається дегідратація еритроцитів, об'єм клітин зменшується і збільшується внутрішньоклітинна концентрація розчину. При цьому пошкодження еритроцитів корелюють з виникненням ехіноцитоза (зморщування еритроцитів) і токсичною дією збільшення концентрації розчинів ("ефект розчинів"). Пошкодження при повільному охолодженні залежать від зміни складу розчину і властивостей кріоконсервуючого середовища. Перші роботи були зроблені Джейсом Лавлоком (Lovelock, 1953) в 1953 році, де було показано, що при дії критичних температур концентрація зовнішньо- і внутрішньоклітинних солей досягає 0,8 моль/л під час заморожування, що призводить до незворотних змін еритроцитів після тривалої дії заморожування і відігрівання. Пізніше, в 1960 р., Меріман (Merzhan, 1960) передбачив, що еритроцити можуть підтримувати осмотичну рівновагу до мінімального об'єму клітин, досягнувши якого відбуваються незворотні зміни в проникності мембрани, витік іонів і вихід їх в міжклітинне середовище. У сучасному уявленні про кріопошкоджуючу дію при повільному охолодженні, окрім "ефекту розчинів", існують пошкодження, що виникають при взаємодії з кристалами льоду і при "упаковці еритроцитів" у незаморожених каналах.

Проникність мембрани для води залежить від температури (Mazur, 1963). Коли еритроцити охолоджують швидко, кристали льоду формуються позаклітинно і концентрація розчинів збільшується набагато швидше, ніж вихід води з клітин. Якщо цитоплазма клітини охолоджується нижче за точку замерзання, відбувається формування внутрішньоклітинних кристалів льоду. Цей механізм формування до кінця не вивчений. Внутрішньоклітинні кристали льоду мають летальний результат для еритроцитів, і цього потрібно уникати. Дегідратації, збільшення концентрації розчинів і пошкодження мембрани при заморожуванні можна уникнути, використовуючи спеціальні умови охолодження.

Достатнє виживання еритроцитів може бути досягнуте використанням оптимальних швидкостей охолодження, що приведе до мінімального пошкодження від "ефекту розчинів" і формування внутрішньоклітинних кристалів льоду. Оптимальна швидкість охолодження залежить від заморожуваного розчину і може бути модифікована при додаванні кріопротекторів. Заморожування еритроцитів при повільних швидкостях охолодження (1°C/хв.) призводить до 95% гемолізу. Рівень гемолізу значно знижується при збільшенні швидкості охолодження до 2300°C/хв (Rapatz, Sullivan, & Luyet, 1968).

Окрім описаних кріопошкоджень, у даний час обговорюється безліч інших: суперохолодження цитоплазми, нуклеація льоду і зростання його кристалів, осмотичний стрес, рекристалізація під час відтаювання та інші.

**Кріопротектори.** Кріопротектори, що використовуються для кріоконсервування еритроцитів, по їх хімічній дії і проникності через мембрану поділяють на дві групи: проникаючі і непроникаючі крізь мембрану (Pushkar, & Belous, 1975).

Непроникаючі кріопротектори – цукор, полімери і крохмаль (поліетиленгліколь – ПЕГ, гідроксиетильований крохмаль – ГЕК,

полівінілпіролідон – ПВП), ефективні в мілімолярних концентраціях і забезпечують захист шляхом дегідратації клітин при заморожуванні, знижуючи кількість внутрішньоклітинних кристалів льоду, і при великих швидкостях охолодження клітини замерзають до досягнення критичного рівня збільшення розчинів солей. Крім того вважають, що вони стабілізують мембрану і підтримують клітини в нативному стані.

Проникаючі кріопротектори – гліцерол і диметилсульфоксид (ДМСО) проникають всередину клітини. Вони запобігають зменшенню об'єму клітин і збільшенню летальної концентрації електролітів, знижуючи температуру, при якій досягається критична концентрація солей, тобто вони знижують точку замерзання розчину, що призводить до зниження кількості формування кристалів льоду в клітині.

Гліцерол є класичним і кращим кріопротектором для еритроцитів людини, оскільки він нетоксичний при високих концентраціях і швидко проникає в клітини при 37°C. Проте перед вживанням в клінічній практиці його потрібно обов'язково видаляти з клітини для уникнення внутрішньосудинного гемолізу, а це набагато ускладнює процедуру підготовки деконсервованих клітин до трансфузії.

**Методи кріоконсервування еритроцитів тварин.** Методи кріоконсервування еритроцитів розрізняються по вживанню кріопротекторів (проникаючі і непроникаючі), а також по швидкостях охолодження клітин. Оптимальна швидкість охолодження залежить від типу заморожуваних клітин і використаного кріопротекторного розчину. Тому методи кріоконсервування умовно поділяють на основі використання проникаючих і непроникаючих кріопротекторів.

**Методи кріоконсервування еритроцитів тварин з проникаючими кріопротекторами.** Перші роботи по кріоконсервуванню еритроцитів тварин опублікували Лавлок та інш. (Lovelock, & Bishop, 1959), які вивчали кріопротекторні властивості гліцерола і диметилсульфоксиду (ДМСО) на еритроцитах бика. Показано, що гліцерол не здатний надати захисної дії при низькотемпературній дії, що корелює з низьким проникненням його в клітини. Низька проникність гліцеролу в еритроцити бика підтверджена роботами Mazur P. et al. (Mazur, Miller, Leibo, 1974; Zhegunov, & Denisova, 2010). Деякі речовини проходять через клітинні мембрани з швидкістю дифузії, що значно перевищує швидкість через ліпідний бішар. Забезпечення і регуляція їх перенесення здійснюється водними каналами (аквапоринами), які мають вибірковість до проникаючих молекул. Серед 13 відомих аквапоринів (AQP) ссавців були виділені AQP3, AQP7, AQP9 і AQP10 як сімейство аквагліцеропоринів, здібних до перенесення гліцеролу (Liu et al., 2007; Yang, Ma, & Verkman, 2001). AQP3 ідентифікований як важливий канал для транспорту гліцеролу в еритроцитах людини і щурів. Швидкість дифузії гліцерола через мембрану залежить від складу жирних кислот (текучості мембран) і наявності спеціального водного каналу – аквапорину-3 (AQP 3). В еритроцитах людини, порівняно з іншими видами ссавців, текучість ліпідного бішару вище, тому і швидкість дифузії гліцеролу через їх мембрану вища. Еритроцити мишей не мають AQP3, але головним каналом для

транспорту гліцеролу в цих клітинах є AQP 9. Можливо, в інших видів тварин відсутні подібні білкові канали або вони не є аквагліцеропоринами, що може зумовлювати низьку проникність їх мембран для молекул гліцеролу.

ДМСО в концентрації 10 і 15% захищає клітини від пошкоджень при криоконсервуванні. При цьому еквілібрація в розчині кріопротектора до заморожування протягом 2 годин наносить більше пошкоджень, ніж протягом 30 хвилин.

Valeri C.R. et al. (1983) досліджували заморожування і зберігання еритроцитів коня при -150 °C. Було показано, що 20 %-й гліцерол здатний забезпечити прийнятний рівень захисту клітин при низькотемпературному зберіганні впродовж 5 років. При вивченні збереження еритроцитів макак (*rhesus macaques*) при криоконсервуванні (Valery et al., 1983) вони дійшли висновку, що 40% гліцерол володіє кріопротекторними властивостями при заморожуванні до -80 °C. При цьому зберігається 87 % клітин, посттрансфузійне виживання протягом 24 годин – 85 %, а тривалість життя деконсервованих еритроцитів – 13 днів.

Відносно еритроцитів собаки було виявлено, що гліцерол може бути ефективним при зберіганні їх в рідкому азоті (Aktaran, & Özcan, 2016; Contreras et al., 1979; Kim et al., 2004). При цьому використовували його високу концентрацію (40 %) і заморожування здійснювали до -80 °C. Оцінка морфо-функціональних показників таких еритроцитів свідчить про те, що основні функціональні параметри – рівень 2,3-ДФГ і АТФ відразу після розморожування не відрізняються від контролю, а форма клітин за умови їх фіксації глутаровим альдегідом представлена, в основному, дискоцитами. При використанні цього методу потрібна висока концентрація кріопротектора (40 %), що створює складнішу процедуру видалення його з клітин. Іншими авторами (Denysova, 2006; Pogozhykh et al., 2017) показано, що гліцерол в концентрації 5 – 20 % не здатний забезпечити захист еритроцитів коня і собаки при швидкому заморожуванні до -196°C. Ця невідповідність може бути зв'язана із застосуванням складного багатоетапного процесу додавання кріопротектора в суспензію клітин перед заморожуванням (Contreras et al., 1979). Вживання такого підходу резонанне в експериментальних умовах, проте економічно і технічно малоефективне в умовах створення кріобанку.

Високий відсоток збереження клітин (еритроцити собаки, коня, бика) при дії низькотемпературних чинників досягається використанням ДМСО (Denisova, Zhegunov, & Babijchuk, 2005). Еритроцити, криоконсервовані з ДМСО, проявляють високу стійкість у фізіологічних умовах з підтримкою нормальної осмотичної крихкості. Проте, можливий прояв токсичної дії ДМСО. Тому потрібно з особливою обережністю відноситись до процедури видалення кріопротектора перед процесом трансфузії.

Методи криоконсервування еритроцитів на основі непроникаючих кріопротекторів. При створенні кріобанків використання проникаючих

кріопротекторів створює певні технологічні проблеми. Осмотична активність викликає необхідність їхнього видалення перед перенесенням в ізотонічні умови з метою запобігання лізису клітин. На відміну від них непроникаючі кріопротектори в невеликих кількостях можуть бути внесені до кровосносного русла реципієнта в процесі трансфузії деконсервованої крові через малу їх токсичність. У зв'язку з цим активно розробляються технології без видалення кріопротектору, вивчаються різні сполуки щодо їх придатності як непроникаючих кріопротекторів.

Ряд авторів (Graham, Meola, Kini, & Hoffman, 2015; Kim et al., 2004; Kim et al., 2005; Pervushina, Zhegunov, & Denisova, 2014; Pogozhykh et al., 2017) використовували в своїх дослідженнях в якості кріопротектора еритроцитів собак гідроксиетильований крохмаль (ГЕК) м.м. 200 в концентрації 25 – 35 %. Заморожування здійснювали їх зануренням в рідкий азот. При цьому зберігалось до 80 % клітин. Для еритроцитів курей показана висока виживаність клітин після криоконсервування з ГЕК в концентрації 15 – 25 %. Проте, незалежно від концентрації ГЕК, спостерігається високий рівень апоптозу і загибель клітин. Переливання таких деконсервованих клітин може привести до посттрансфузійного гемолізу у птиці.

Високе збереження клітин після циклу заморожування-відігрівання досягається при використанні поліетилєнгліколя (ПЕГ м.м. 1500) як кріопротектора для еритроцитів коня, бика і собаки (Denysova, 2006). Кріопротектор додають дозовано, протягом 40 хвилин, в холодних умовах. При цьому виживаність клітин складає до 97 %. Для успішного переливання клітини мають бути стабільними у фізіологічних умовах, володіти достатніми механо-еластичними властивостями для проходження по капілярах. При оцінці цих параметрів після циклу заморожування-відігрівання показано, що вони стають більш крихкими і менш еластичними.

### Висновки

У ветеринарній медицині існує велика необхідність у довгостроковому зберіганні еритроцитів тварин із збереженням їх цілісності і фізіологічної активності. Хоча технології криоконсервування еритроцитів людини досить розвинені, але відносно еритроцитів ссавців є лише поодинокі дослідження. Недостатньо вивченою залишається поведінка еритроцитів різних видів ссавців в умовах дії низьких температур і кріопротекторів. Успіх криоконсервування залежить від багатьох факторів: правильний вибір кріопротектора, його концентрації, спосіб його додавання до клітинної суспензії, продовження експонування на етапі насичення кріопротектором. Актуальним є вивчення кріопротекторів різних механізмів дії і їх концентрації на морфо-функціональні показники, а також тестування деконсервованих клітин на функціональну активність після заморожування-відігрівання і розробка на цій основі адекватних методів довгострокового зберігання донорської крові домашніх тварин.

### References

- Agar, N. S., & Board, P. G. (1983). *Red blood cells of domestic mammals*. New York: Elsevier Science Publishers.  
Aktaran, B. D., & Özcan, M. (2016). The effects of freezing on long-term storage of canine erythrocytes. *Pol J Vet Sci*, 19, 401-406. Retrieved from <https://content.sciendo.com/view/journals/pjvs/19/2/article-p401.xml>.



- Contreras, T. J., Lindberg, J. R., Lowrie, G. B., & et al. (1979). Liquid and freeze-preservation of dog red blood cells. *Transfusion*, 19, 279-292.
- Denisova, O. N., Zhegunov, G. F., & Babijchuk, L. A. (2005). Kriokonservirovanie e`ritrocytov zhyvotny`x pod zashhitoj dimetilsul`foksida, polie`tilenoksida, glicerina. *Problemy` kriobiologii*, 2, 195-201. Retrieved from [http://nbuv.gov.ua/UJRN/KrioBiol\\_2005\\_15\\_2\\_11](http://nbuv.gov.ua/UJRN/KrioBiol_2005_15_2_11) (in Ukrainian).
- Denysova, O. M. (2006). *Kriochutlyvist erytrotsytiv riznykh vydiv ssavtsiv*. (Master's thesis). Instytut problem kriobiologii i kriomedycyny NAN Ukrainy, Kharkiv (in Ukrainian).
- Feldman, B. F., & Kristensen, A. T. (1995). Modern veterinary blood banking practices and their applications in companion animal practice. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 25, 1231-1243.
- Graham, J. E., Meola, D. M., Kini, N. R., & Hoffman, A. M. (2015). Comparison of the effects of glycerol, dimethyl sulfoxide, and hydroxyethyl starch solutions for cryopreservation of avian red blood cells. *Send to Am J Vet Res*, 76, 487-493. Retrieved from <https://avmajournals.avma.org/doi/pdf/10.2460/ajvr.76.6.487>.
- Kaufman, P. M. (1992). Supplies for blood transfusions in dogs and cats. *Probl. Vet. Med.*, 4, 582-593.
- Kim, H., Tanaka, S., Une, S., & et al. (2004). A comparative study of the effects of glycerol and hydroxyethyl starch in canine red blood cell cryopreservation. *J Vet Med Sc.*, 66, 1543-1547. Retrieved from [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/66/12/66\\_12\\_1543/\\_pdf-char/en](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/66/12/66_12_1543/_pdf-char/en).
- Kim, H., Itamoto, T., Une, S., & et al. (2005). Application of phosphoenolpyruvate into canine red blood cell cryopreservation with hydroxyethyl starch. *Cryo Letters*, 26, 1-6.
- Lovelock, J. E. (1953). The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta*, 11, 28-36.
- Lovelock, J. E., & Bishop, M. W. (1959). Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature*, 183, 1394-1395.
- Liu, Y., Promeneur, P., Rojek, A., & et al. (2007). Aquaporin 9 is the major pathway for glycerol uptake by mouse erythrocytes, with implications for malarial virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 104, 12560-12564. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1941508/>.
- Mazur, P. (1963). Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *The Journal of General Physiology*, 10, 347-369. Retrieved from <http://jgp.rupress.org/content/47/2/347.long>.
- Mazur, P., Miller, R. H., & Leibo, S. P. (1974). Survival of frozen-thawed bovine red cells as a function of the permeation of glycerol and sucrose. *J Membr Biol*, 15, 137-158.
- Mazur, P., Leibo, S.P., & Chu, E.H. (1972). A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp Cell Res*, 72, 345-35.
- Meryman, H. T. (1960). General principles of freezing and freezing injury in cellular materials. *Ann N Y Acad Sci*, 85, 503-509.
- Obrador, R., Musulin, S., Hansen, B. (2015). Red blood cell storage lesion. *J. Vet. Emerg. Crit. Care. (San Antonio)*, 25, 187-199.
- Pervushina, O. A., Zhegunov, G. F., & Denisova, O. N. (2014). Vliyanie kriokonservirovaniya na soxranost` i osmoticheskuyu xrupkost` e`ritrocytov domashnix zhyvotny`x. *Problemi zooinzhenarii ta veterinarnoi medicini*, 28, 408-410 (in Ukrainian).
- Pogozhykh, B., Pakhomova, Y., Pervushina, O., & et al. (2017). Exploring the Possibility of Cryopreservation of Feline and Canine Erythrocytes by Rapid Freezing with Penetrating and Non-Penetrating Cryoprotectants. *PLoS One*, 12, 1-12. Retrieved from <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0169689>
- Pushkar, N. E., & Belous, A. M. (1975). *Vvedenie v kriobiologiyu*. Kiev: Naukova dumka (in Russian).
- Rapatz, G., Sullivan, J. J., & Luyet, B. (1968). Preservation of erythrocytes in blood containing various cryoprotective agents, frozen at various rates and brought to a given final temperature. *Cryobiology*, 5, 18-25.
- Valery, C. R., Valery, D. A., Gray, A., & et al. (1983). Rhesus macaque red blood cells frozen with 40% glycerol and stored at -80 C. *Send to Am J Vet Res*, 44, 1786-1789.
- Valery, S. R., Valery, D. A., Gray, A., & et al. (1983). Horse red blood cells frozen with 20% (w/v) glycerol and stored at -150 C for five years. *Am J Vet Res*, 44, 2200-2202.
- Yang, B., Ma, T., & Verkman, A. (2001). Erythrocyte water permeability and renal function in double knockout mice lacking aquaporin-1 and aquaporin-3. *J Biol Chem*, 276, 624-626. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/276/1/624.long>
- Zhegunov, G. F., & Denisova, O. N. (2010). Proniczaemost` e`ritrocytov mlekopitayushhix dlya molekul glicerina i DMSO i stepen` soxranosti kletok posle zamorazhivaniya-ottaivaniya. *Dopovidi NAN Ukraïni*, 139-143. Retrieved from <http://dspace.nbuv.gov.ua/bitstream/handle/123456789/31118/23-Zhegunov.pdf> (in Ukrainian).