

Polessie Meat breed for the correction of diets deficient in trace elements in the form of inorganic salts and chelate compounds metionativ and lysinate .

Key words: trace elements, blood, iron, copper, zinc, manganese, cobalt, blood, bull, inorganic salts, metionaty, lysinate, red blood cells, white blood cells, total protein.

УДК 57.086.13:612.111:623

ВЛИЯНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ НА СОХРАННОСТЬ И ОСМОТИЧЕСКУЮ ХРУПКОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ

Первушина О.А., аспирант
Жегунов Г.Ф., д.б.н, профессор
Денисова О.Н., к.б.н., доцент
olya_kos@rambler.ru

Харьковская государственная зооветеринарная академия, г. Харьков

Аннотация. В работе исследована сохранность и осмотическая хрупкость эритроцитов собаки, кошки и лошади после замораживания - отогрева под защитой комбинированных криопротекторов. Показано, что эритроциты всех видов исследуемых животных после замораживания – отогрева демонстрируют более высокую осмотическую хрупкость, что проявляется в сдвиге кривой лизиса эритроцитов в гипотонических растворах в сторону увеличения концентрации NaCl. Комбинирование проникающего и непроникающего криопротектора способствовало снижению осмотического стресса при замораживании.

Ключевые слова: эритроциты, гемолиз, диметилсульфоксид, гидроксипентилкрахмал, глицерин, криоконсервирование, осмотическая хрупкость.

Актуальность проблемы. Долгосрочное хранение биологических объектов в условиях криоконсервирования имеет важное значение, как для медицины, так и для ветеринарии [1]. В настоящее время разработаны эффективные методы криоконсервирования эритроцитов человека, однако для животных таких технологий нет.

Имеются работы, в которых показано, что глицерин малоэффективен при криоконсервировании эритроцитов млекопитающих, а диметилсульфоксид (ДМСО) в 10 % концентрации может защищать эритроциты в процессе замораживания – отогрева [2]. Однако ДМСО в больших концентрациях оказывает цитотоксическое влияние на клетки. Гидроксипентилкрахмал (ГЭК) является перспективным криопротектором для криоконсервации эритроцитов, так как является нетоксичным плазмозаменителем и в отличие от ДМСО и глицерина не требует трудоемкого удаления из клеток.

В последнее время широкое применение находят комбинированные криопротекторы (проникающие и непроникающие). Такие комбинации позволяют снизить концентрацию проникающих криопротекторов, что обеспечивает сохранение осмотической устойчивости клеток при замораживании – отогреве и позволяет упростить отмывание эритроцитов после замораживания. В работе были использованы не только ГЭК, но и его комбинации ДМСО + ГЭК, глицерин + ГЭК, что позволило снизить концентрацию проникающих криопротекторов, тем самым снизить токсический эффект и предотвратить гиперосмотический шок.

Известно, что осмотические явления, связанные с переносом различных веществ через избирательно проницаемые мембраны, вносят значительный вклад в повреждение и защиту клеток на различных этапах криоконсервирования [1]. Поэтому изучали осмотическую хрупкость, что является одним из критериев оценки сохранности мембран эритроцитов после воздействия экстремальных факторов. Представляло интерес провести сравнительное исследование устойчивости эритроцитов собаки, кошки и лошади к факторам низкотемпературного воздействия.

Цель работы. Исследование сохранности и осмотической хрупкости эритроцитов домашних животных после замораживания - отогрева под защитой комбинированных криопротекторов.

Материалы и методы исследования. Материалом исследования служили эритроциты

лошади, собаки и кошки. Животные были здоровыми, половозрелыми самцами. Манипуляции с животными проводили согласно Международным принципам Европейской конвенции о защите позвоночных животных (Страсбург, 1985 г.).

Кровь заготавливали на глюкозо-цитратном консерванте и хранили не более 4 часов при 4°C до проведения экспериментов. Эритроциты осаждали центрифугированием при 750 g 5 мин. После удаления плазмы эритроциты трижды промывали 5-кратным объемом изотонического солевого раствора (150 мМ NaCl, 10 мМ трис - HCl, pH 7,4).

Для криоконсервирования эритроцитов использовались следующие криоконсервирующие среды:

1. 15% ДМСО, 25% ГЭК, 150 мМ NaCl, 10 мМ трис - HCl, pH 7,4;
2. 15% Глицерин, 25% ГЭК, 150 мМ NaCl, 10 мМ трис - HCl, pH 7,4;
3. 35% ГЭК, 150 мМ NaCl, 10 мМ трис - HCl, pH 7,4;

Раствор криопротекторов смешивали с эритро массой в соотношении 1:1 и выдерживали 15 мин при 22°C для эритроцитов лошади, 20 мин – для кошки и 30 мин – для собаки. Замораживание осуществляли в микротюбиках «EPENDORFF» объемом 5мл и 2 мл. Размораживание проводили на водяной бане (40° - 42°C).

Уровень гемолиза определяли спектрофотометрически при 543 нм [9]:

$$\% \text{ гемолиза} = [A_1/A_2] \times 100\%$$

где, A₁ - оптическая плотность исследованной пробы

A₂ - оптическая плотность при полном гемолизе контрольной пробы

Криопротектор удаляли путем серийного центрифугирования. На первом этапе к суспензии эритроцитов добавляли равный объем 0,6 М NaCl, 10 мМ трис - HCl, pH 7,4. После этого эритроциты дважды промывали 150 Мм NaCl, 10 мМ трис - HCl, pH 7,4.

Осмотическую хрупкость определяли по методу [3], оценивая устойчивость клеток в гипотонических растворах NaCl в интервале от 0,1% до 0,9 %.

Экспериментальные результаты представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего. Различия между группами считали статистически достоверными при P<0,05.

Результаты исследования. Основным критерием оценки целостности и сохранности эритроцитов является степень гемолиза после экстремальных воздействий [1]. Поэтому представляло интерес изучить уровень гемолиза эритроцитов лошади, собаки и кошки после замораживания – отогрева и удаления проникающего криопротектора.

В табл. 1 представлен уровень гемолиза различных видов эритроцитов после замораживания – отогрева и удаления криопротектора .

Таблица 1.

Уровень гемолиза эритроцитов после замораживания – отогрева (ЗО) и удаления криопротектора (УК), %

Эритроциты	Комбинации криопротекторов (конечные концентрации)				
	7,5% ДМСО + 12,5% ГЭК I		7,5% глицерин + 12,5% ГЭК II		17,5% ГЭК III
	ЗО	УК	ЗО	УК	ЗО
Лошади	4,44±0,26	18,5±1,36	14,58±1,48	43,88±4,62	13,44±1,37
Собаки	32±2,34	94,34±1,38	15,34±1,69	46,02±2,06	8,9±0,98
Кошки	38,62±1,98	98,92±2,57	8,46±0,48	25,14±1,56	16,2±1,85

Из таблицы видно, что для эритроцитов лошади наиболее успешной оказалась первая комбинация, уровень гемолиза после замораживания – отогрева составил 4,44 %, а после удаления криопротектора – 18,5 %. Для эритроцитов собаки высокий уровень сохранности клеток обеспечил ГЭК в 17,5 % концентрации, уровень гемолиза при этом составил 8,9 %. Вторая комбинация криопротекторов также обеспечивает высокий уровень сохранности, гемолиз при этом составил 15,34 %, но удаление криопротектора оказывает негативное влияние на клетки и гемолиз при этом составил 46,02%. Для эритроцитов кошки высокую защиту после процедур замораживания – отогрева оказала вторая комбинация. Уровень гемолиза при этом 8,46%, а после удаления криопротектора 25,14 %, что является допустимой нормой при отмывании клеток. Следует отметить, что процесс удаления криопротектора во всех случаях после замораживания – отогрева приводит к значительному повышению уровня гемолиза, что говорит о наличии скрытых повреждений клеток, которые проявляются только после отмывания.

Эритроциты в русле крови должны выдерживать различные механические напряжения, возникающие при движении по капиллярам. Показателем, отражающим пластические свойства эритроцитов, является индекс осмотической хрупкости. Определение этого показателя предполагает изучение поведения клеток в гипотонических растворах.

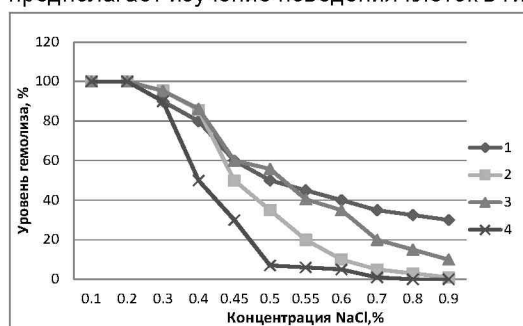


Рис. 1. Кривые осмотической хрупкости эритроцитов собаки

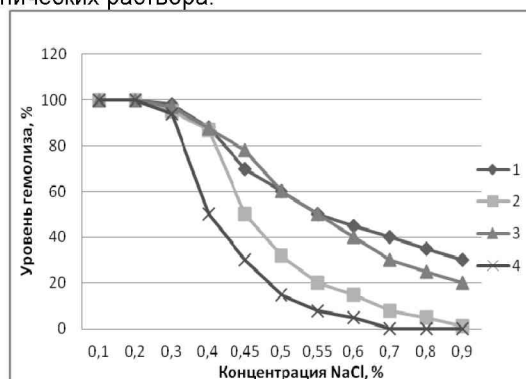


Рис. 2. Кривые осмотической хрупкости эритроцитов кошки

Клетки, криоконсервированные под защитой 17,5 % ГЭК;
 Клетки, криоконсервированные под защитой 7,5 % ДМСО + 12,5 % ГЭК;
 Клетки, криоконсервированные под защитой 7,5 % глицерин + 12,5 % ГЭК;
 Контрольные клетки

Клетки, криоконсервированные под защитой 17,5 % ГЭК;
 Клетки, криоконсервированные под защитой 7,5 % ДМСО + 12,5 % ГЭК;
 Клетки, криоконсервированные под защитой 7,5 % глицерин + 12,5 % ГЭК;
 Контрольные клетки

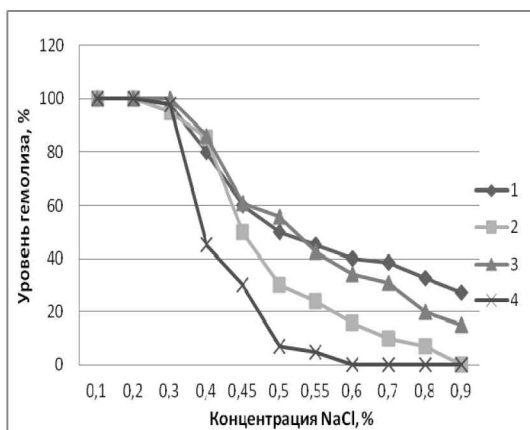


Рис. 3. Кривые осмотической хрупкости эритроцитов лошади

Клетки, криоконсервированные под защитой 17,5 % ГЭК;
 Клетки, криоконсервированные под защитой 7,5 % ДМСО + 12,5 % ГЭК;
 Клетки, криоконсервированные под защитой 7,5 % глицерин + 12,5 % ГЭК;
 Контрольные клетки

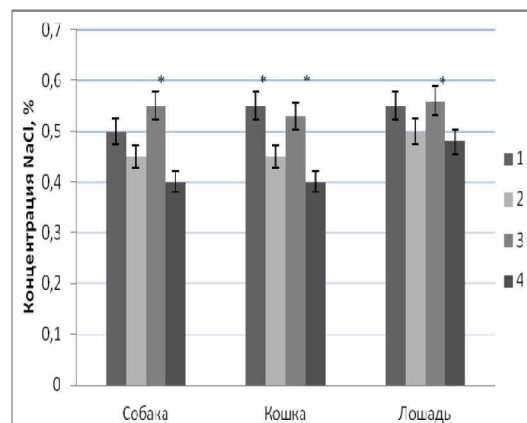


Рис. 4. Индекс осмотической хрупкости эритроцитов собаки, кошки и лошади:

Клетки, криоконсервированные под защитой 17,5 % ГЭК;
 Клетки, криоконсервированные под защитой 7,5 % ДМСО + 12,5 % ГЭК;
 Клетки, криоконсервированные под защитой 7,5 % глицерин + 12,5 % ГЭК;
 Контрольные клетки
 n = 5, *p<0,05 (по сравнению с контролем).

На рис. 1, 2, 3 представлены кривые осмотической хрупкости эритроцитов собаки, кошки и лошади. Клетки, криоконсервированные под защитой комбинированного криопротектора (ДМСО + ГЭК) отвечают на осмотические воздействия незначительными изменениями, тогда как рост

осмотической хрупкости наблюдается при использовании 17,5% ГЭК и 7,5 % глицерин + 12,5 % ГЭК, что видно из сдвига кривой лизиса эритроцитов в гипотонических растворах в сторону увеличения концентрации NaCl.

Подобное поведение кривых осмотической хрупкости было выявлено для эритроцитов, замороженных в среде с трегалозой или декстраном [10]. То есть это подтверждает то, что полученный эффект выявляется только после замораживания эритроцитов в средах с непроникающими криопротекторами.

Можно сделать заключение, что степень повреждения у всех исследуемых типов клеток, криоконсервируемых под защитой не только комбинируемых криопротекторов, но и однокомпонентного, достаточно высок. Однако включение в среду ДМСО несколько уменьшает этот показатель.

На рис. 4 показан индекс осмотической хрупкости, определенный как концентрация NaCl при которой происходит 50 % гемолиз. Из этого рисунка видно, что эритроциты отвечают сходно на действие гипотонии после действия факторов криоконсервации – увеличивают осмотическую хрупкость. Установлено, что ДМСО положительно влияет на коэффициент осмотической хрупкости изученных видов эритроцитов. Так после процедуры криоконсервирования в его присутствии индекс осмотической хрупкости увеличивается в меньшей степени. Тогда как этот показатель для всех видов животных, криоконсервируемых под защитой 17,5 % ГЭК и комбинации 7,5% глицерин + 12,5 % ГЭК - значительно повышен. Для эритроцитов собаки и лошади наиболее высокий индекс отмечается при криоконсервировании эритроцитов под защитой глицерина + ГЭК, а для кошки при криоконсервировании под защитой 17,5 % ГЭК. Это свидетельствует о том, что эритроциты собаки, кошки и лошади после замораживания – отогрева под защитой 17,5 % ГЭК и 7,5 % глицерина + 12,5 % ГЭК теряют свои эластические свойства и становятся более хрупкими.

Если сравнивать видовую особенность эритроцитов, то можно сказать о том что контрольные эритроциты лошади менее осмотически устойчивы, чем клетки собаки и кошки. Возможно это связано со структурными особенностями мембранного - цитоскелетного комплекса эритроцитов [7]. Так авторами [5] при изучении белков мембран эритроцитов с помощью электрофореза было выявлено, что белок полосы 4.2, который отвечает за стабилизацию мембраны, присутствуют у собаки и кошки, однако в эритроцитах лошади выявлен дефицит этого белка. Известно [6], что его дефицит приводит к хрупкости эритроцитов.

Таким образом в работе показано, что все изученные виды эритроцитов требуют для сохранности в процессе замораживания-отогрева разные комбинации и концентрации криопротекторов, что связано с их структурными и функциональными особенностями.

Выводы

1. Использование комбинированного криопротектора 7,5% ДМСО + 12,5 % ГЭК для эритроцитов лошади позволяет сохранить до 80 % клеток без удаления криопротектора. Для эритроцитов собаки наиболее успешным оказался 17,5 % ГЭК, сохранность при этом 90 %, а для кошки 7,5 % глицерин + 12,5 % ГЭК, сохранность – 90 %.
2. Эритроциты всех исследуемых животных проявляют сходную реакцию на действие гипотонии, т.е. обладают сходными механо – эластическими свойствами. Наименее устойчивыми к гипотонической среде являются эритроциты лошади.

Литература

1. Белоус А.М. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении / А.М. Белоус, В.А. Бондаренко. – Киев: Наук. думка, 1982. – 255 с.
2. Денисова О.Н. Криоконсервирование эритроцитов животных под защитой диметилсульфоксида, полиэтиленгликоля, глицерина / Жегунов Г.Ф., Бабийчук Л. А. // Проблемы криобиологии. – 2005. – №2. – С. 195-201.
3. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике: Методы гематологических исследований / Меньшиков В.В. – М.: Медицина, 1987. – 363 с.
4. Clapisson G. Cryopreservation with hydroxyethylstarch (HES) + dimethylsulfoxide (DMSO) gives better results than DMSO alone / Clapisson G. // Bull Cancer. – 2004. – Vol. 91, N4. – P. E97–102.
5. Guerra-Shinohara E.M., Barretto O.C. The erythrocyte cytoskeleton protein 4.2 is not demonstrable in several mammalian species / Guerra-Shinohara E.M., Barretto O.C. // Braz J Med Biol Res.(1999)32:683-687
6. Ideguchi H. Genetic defect of erythrocyte band 4.2 protein associated with hereditary spherocytosis/ Ideguchi H, Nishimura J, Nawata H. // Brit. J. Haemat. 74: 347-353.
7. Kaneko J.J. Clinical biochemistry of domestic animals / Kaneko J.J., Harvey J.W., Bruss M. New York: Academic Press, 1989. – 932 p.
8. Kim H. A comparative study of the effects of glycerol and hydroxyethyl starch in canine red blood cell

- cryopreservation / Kim H. //J Vet Med Sci. 2004 Dec; 66(12):1543-1547
9. Mazur P., Miller R.H. Permeability of the human erythrocytes to glycerol in 1 and 2M solutions at 0 and 20°C / Mazur P., Miller R.H. // Cryobiology. –976. – Vol.13. – P. 507–522.
10. Pellerin-Mendes C. In vitro study of the protective effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen/ Pellerin-Mendes C., Million L., Marchand-Arvier M. //Cryobiology.– 1997.– Vol. 35, N2.– P. 173–186.

**ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ НА ЗБЕРЕЖЕННЯ ТА ОСМОТИЧНУ КРИХКІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ
ДОМАШНІХ ТВАРИН**

Первушина О.А., аспірант, Жегунов Г.Ф., д.б.н., професор, Денисова О.М., к.б.н., доцент
Харківська державна зооветеринарна академія

Анотація. У роботі досліджена ступінь збереження і осмотична крихкість еритроцитів собаки, кішки і коня після заморожування - відігрівання під захистом комбінованих криопротекторів (ГЕК + ДМСО). Показано, що еритроцити всіх видів досліджуваних тварин після заморожування - відігрівання демонструють вищу осмотичну крихкість. Комбінування проникаючого і непроникаючого криопротекторів сприяло зниженню осмотичного стресу при заморожуванні.

Ключові слова: еритроцити, гемоліз, диметилсульфоксид, гідроксиетилкрахмал, гліцерин, криоконсервування, осмотична крихкість.

**EFFECT OF CRYOPRESERVATION ON PRESERVATION AND OSMOTIC FRAGILITY OF
ERYTHROCYTES IN PETS**

Pervushina O.A., post graduate student, Zhegunov G. F., professor, Denisova O.N., candidate boil.science,
reader

Kharkiv State Zooveterinary Academy, Kharkiv, Ukraine

Summary. The degree of erythrocyte preservation and osmotic fragility in horses, dogs and cats after freezing – warming under the protection of combined cryoprotectants (HES + DMSO) has been studied. It was shown, that erythrocyte all types of test animals after freezing - thawing demonstrated a higher osmotic fragility. Combining penetrating and non-penetrating cryoprotectant contributed to the reduction of osmotic stress during freezing.

Key words: erythrocytes, haemolysis, dimethylsulphoxide, hydroxiethylstarch, cryopreservation, cryoprotectors.

УДК:612.017:577.161.1

**ПРИРОДНА РЕЗИСТЕНТНІСТЬ КРОВІ КОРОПІВ ЗА РІЗНОГО СКЛАДУ
РАЦІОНУ ТА РІВНЯ В НЬОМУ ВІТАМІНУ А**

Попик І. М.¹ м. н. с., rysja_p@ukr.net,

Віщур О. І. с. н. с., д. вет. н., завідувач лабораторії імунології,

Стефанишин О. М. с. н. с., к. б. н., завідувач лабораторії біотехнології мікроорганізмів,

Смоляннінов К. Б. с. н. с., к. с.-г. н.,

Соловодзінська І. Є.² к. б. н., доцент кафедри екології та біології

¹Інститут біології тварин НААН, м. Львів

²Львівський національний аграрний університет, м. Львів

Анотація. В статті наведені дані про вплив різного складу раціону та додаткового введення до нього вітаміну А на стан природної резистентності організму коропів. Встановлено, що додавання до стандартного комбікорму ретинілацетату у вигляді масляного розчину призводить до підвищення фагоцитарної, бактерицидної та лізоцимної активності крові. При цьому, у коропів, що споживали стандартний комбікорм рівень фагоцитарної та бактерицидної активності крові був вищим, ніж у крові коропів, що споживали лише природний, наявний у ставку корм.

Ключові слова: короп, раціон, кров, вітамін А, імунітет.

Актуальність проблеми. Відомо, що вітамін А відіграє важливу роль в імунній системі і є необхідним для оптимального функціонування вродженого і адаптивного імунітету організму [1].