

УДК 612.111:636.7/8:57.086.13

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ КОШКИ И СОБАКИ НА ЭТАПАХ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

Первушина О.А., аспирант*
Жегунов Г.Ф., д.б.н, профессор*
Пахомова Ю.С., к.биол.н.**

*Харьковская государственная зооветеринарная академия, г. Харьков

**Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, olya_kos@rambler.ru

Аннотация. В работе методом световой микроскопии исследованы морфологические изменения эритроцитов собаки и кошки до и после замораживания-отогрева в криозащитных растворах, содержащих 10% ДМСО, 17,5% ГЭК и 7,5% глицерин+12,5%ГЭК. Установлено, что эритроциты собаки после замораживания-отогрева под влиянием ДМСО трансформируются в сферозхиноциты, а эритроциты кошки – в эхиноциты. Растворы ГЭК и 7,5% глицерин+12,5% ГЭК вызывают у размороженных и отмытых эритроцитов образование деформированных клеток неправильной формы.

Ключевые слова: эритроциты, гемолиз, диметилсульфоксид, гидроксизтилкрахмал, криоконсервирование, морфология, трансформация,

Актуальность проблемы. Форме эритроцитов принадлежит основная роль в сохранности их функциональных свойств. В норме эритроцит представляет собой двояковогнутый диск, такая форма обеспечивает клетке гибкость и высокую способность к деформации. Дискоидная форма является оптимальной с точки зрения выполнения эритроцитами своей основной функции – транспорта кислорода к тканям организма.

На этапах низкотемпературного консервирования эритроциты подвергаются влиянию различных физико-химических факторов, которые способны изменять структурно-функциональные характеристики мембран эритроцитов, а следовательно их объем и форму [2]. Доказано [6], что значительная морфологическая трансформация эритроцитов человека и животных в процессе замораживания-отогрева из дискоидной в другие формы клеток отражается на их сохранности, жизнеспособности, приживаемости и продолжительности циркуляции в сосудистом русле реципиента. Поэтому важной и актуальной задачей является изучение морфологических характеристик эритроцитов животных на этапах низкотемпературного консервирования.

Цель работы – исследовать морфологию эритроцитов собаки и кошки до и после замораживания-отогрева в криозащитных растворах, содержащих ДМСО, ГЭК и ГЭК в комбинации с глицерином.

Материал и методы исследования. Объектом исследования были эритроциты, выделенные из крови здоровых половозрелых самцов собак и кошек, заготовленной на глюкозо-цитратном гемоконсерванте и хранившейся не более 4-х часов при 4°C. Манипуляции с животными проводили согласно Международным принципам Европейской конвенции о защите позвоночных животных (Страсбург, 1985 г.).

Эритромассу получали методом центрифугирования цельной крови при 750 g в течение 5 мин с последующим удалением плазмы и лейкоцитомоноцитарного слоя. После этого эритроциты трижды отмывали в 4-кратном объеме изотонического солевого раствора (150 мМ NaCl, 10 мМ трис - HCl, pH 7,4).

В качестве криопротекторов использовали ДМСО, ГЭК и глицерин. Растворы криопротекторов готовили на 10 мМ трис-HCl, pH 7,4. Для криоконсервирования эритроцитов использовали криозащитные растворы следующего состава: 10% ДМСО, 17,5% ГЭК и 7,5% глицерин в комбинации с 12,5% ГЭК.

Растворы криопротекторов смешивали с эритромассой в соотношении 1:1 (по объему). Продолжительность экспозиции эритроцитов собаки в криозащитных растворах составила 30 мин, а эритроцитов кошки – 20 мин при температуре 22°C. Исследуемые образцы замораживали в микротюбиках «EPENDORFF» объемом 2 и 5 мл путем погружения в жидкий азот. Образцы отогревали на водяной бане при температуре 40-42°C.

Контролем были эритроциты, которые разводили изотоническим раствором NaCl в соотношении 1:1.

Отмывание эритроцитов от криозащитных растворов осуществляли путем серийного центрифугирования. На первом этапе к суспензии размороженных эритроцитов добавляли равный объем 0,6 М раствора NaCl, затем клетки дважды промывали 150 Мм раствором NaCl.

Морфологические исследования проводили методом световой микроскопии в микроскопе «LEICA DM 750» (Швейцария) с фотографической регистрацией морфологической картины крови. Общее состояние клеток оценивали в капле крови, которую помещали между предметным и покровным стеклом и равномерно распределяли тонким слоем.

В морфологической оценке особенностей формы и поверхностной архитектоники эритроцитов использовали общепринятую классификацию, приведенную в [7].

Результаты исследования. Анализ экспериментальных данных показал, что после трехкратного отмывания эритроцитов животных физиологическим раствором NaCl от плазмы и лейкотромбоцитарного слоя большая часть клеток трансформировалась в эхиноциты (рис.1.1, 1.2).

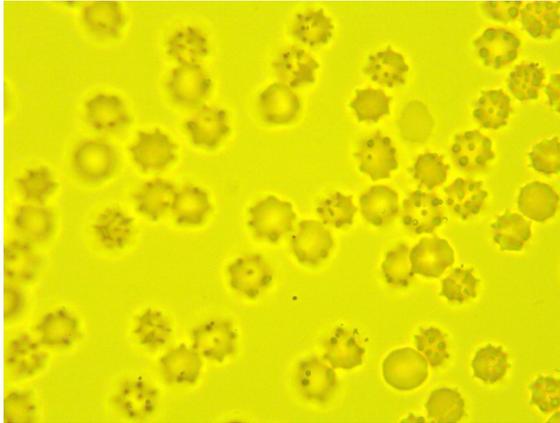


Рис.1.1 Морфология эритроцитов собаки после отмывания изотоническим раствором NaCl, pH 7,4

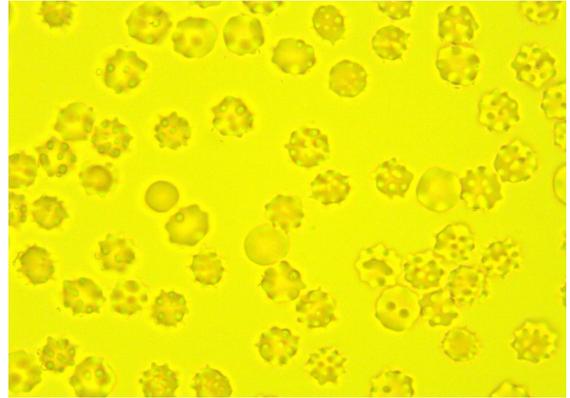
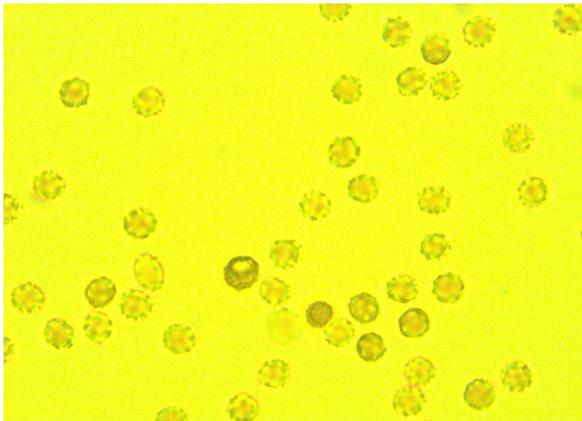


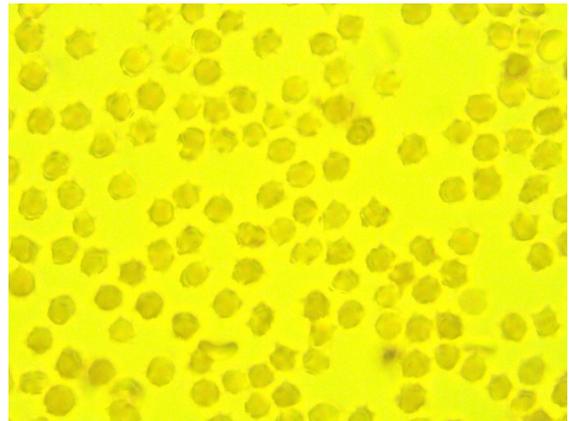
Рис.1.2 Морфология эритроцитов кошки после отмывания изотоническим раствором NaCl, pH 7,4

Считают [8], что кренирование эритроцитов при удалении плазмы обусловлено отсутствием плазменных белков, в частности альбумина. Таким образом, исследование морфологических характеристик эритроцитов в растворах криопротекторов на этапе экспозиции и после замораживания-отогрева проводилось на исходно кренированных клетках.

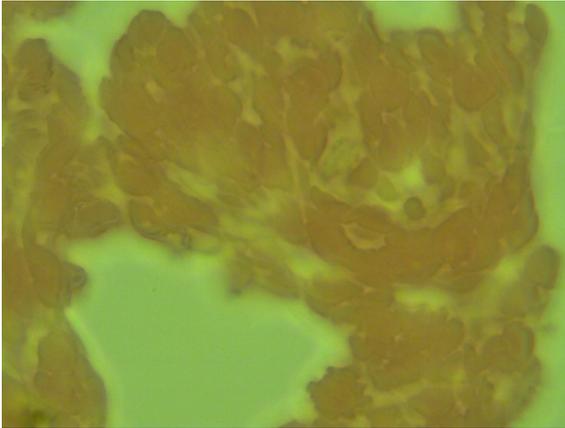
После экспозиции эритроцитов животных в 10 %-ом растворе ДМСО клетки приобретали слабовыраженную эхиноцитарную форму, особенно эритроциты кошки (рис. 2.1, а; рис. 2.2, с). Взаимодействие эритроцитов животных с 17,5% раствором ГЭК приводило к агрегации эритроцитов (рис. 2.1, b; 2.2, d). Подобные результаты были получены в работе [9], в которой было показано, что среды, содержащие высокие концентрации ГЭК влияют на степень агрегации эритроцитов.



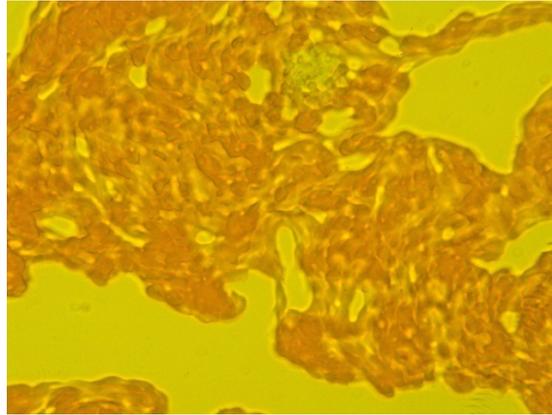
а



с

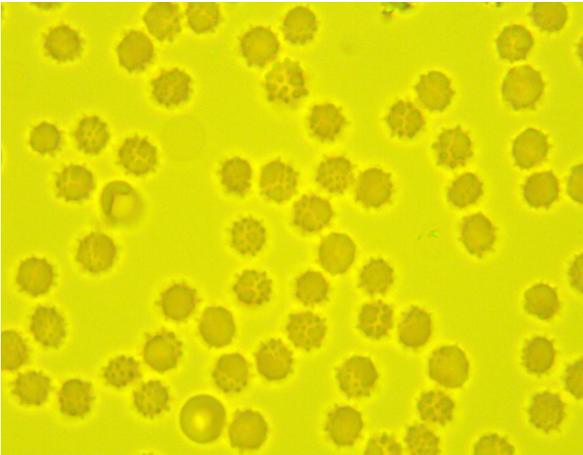


b
Рис.2.1 Морфологические изменения эритроцитов собаки после экспозиции в 10% ДМСО (а) и 17,5% ГЭК (b)

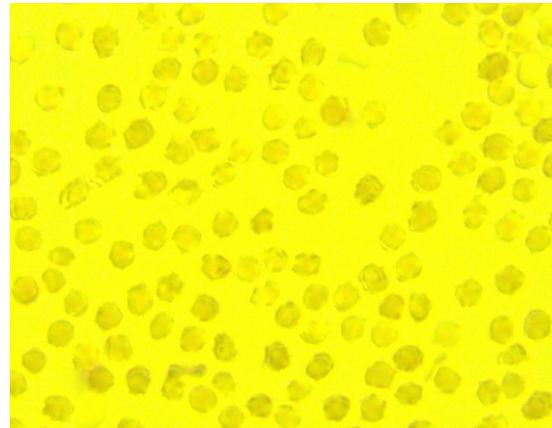


d
Рис.2.2 Морфологические изменения эритроцитов кошки после экспозиции в 10% ДМСО (с) и 17,5% ГЭК (d)

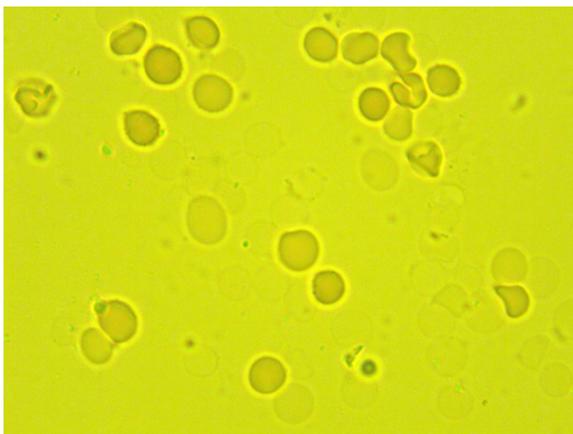
Анализ формы эритроцитов животных криоконсервированных под защитой 10%-го ДМСО показал, что размороженные клетки имели форму дискоцитов с неровными контурами, эхиноцитов и сфероэхиноцитов (рис.3.1, а; 3.2, с). При этом преобладающее большинство эритроцитов собаки трансформировалось в сфероэхиноциты (рис.3.1, а), а эритроциты кошки – в дискоциты с неровными контурами (3.2,с). Так как, после экспозиции эритроцитов в 17,5% растворе ГЭК наблюдалась агрегация эритроцитов животных, то нами после размораживания клеток, было проведено их отмывание от непроникающего криопротектора. На рис. 3.1 (b, d) представлены эритроциты животных после удаления 17,5% ГЭК. Установлено, что после удаления криопротектора эритроциты собаки, трансформировались в сфероциты (рис. 3.1, b), а эритроциты кошки приобретали вид деформированных клеток неправильной формы (3.1, d). Замораживание эритроцитов кошки под защитой комбинированного раствора, содержащего 7,5% глицерина + 12,5% ГЭК, подобно 17,5% раствору ГЭК, приводило к образованию деформированных клеток неправильной формы.



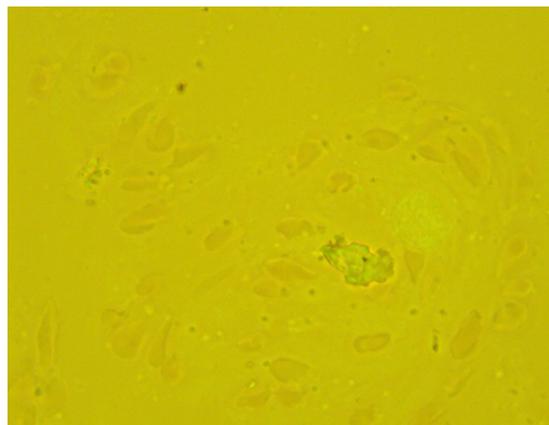
a



c

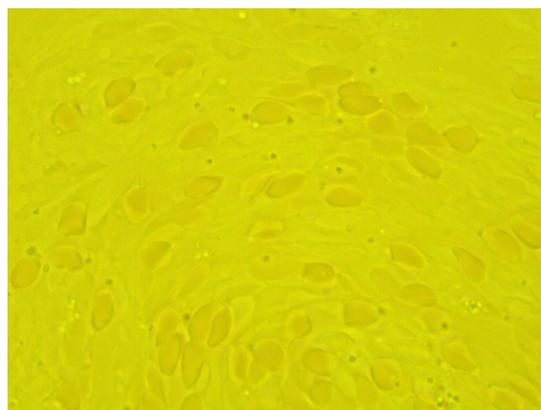


b
Рис. 3.1 Морфологические изменения эритроцитов собаки после криоконсервирования в 10% ДМСО (а) и 17,5% ГЭК(б)



d

Рис. 3.2 Морфологические изменения эритроцитов кошки после криоконсервирования в 10% ДМСО (с), 17,5% ГЭК (d) и комбинированном растворе 7,5%глицерина+12,5%ГЭК(е)



e

Выводы

Полученные результаты свидетельствуют, что сохранность формы эритроцитов собаки и кошки как на этапе экспозиции, так и после замораживания-отогрева зависит от состава криозащитного раствора. Установлено, что использование ГЭК и комбинированного раствора 7,5%глицерин+12,5%ГЭК приводит к агрегации эритроцитов на этапе экспозиции, а их удаление после замораживания-отогрева вызывает образование деформированных клеток неправильной формы. Экспозиция эритроцитов в растворах ДМСО приводит к образованию эхиноцитов. После замораживания-отогрева эритроциты собаки в 10%-ом растворе ДМСО трансформировались в сферозехиноциты, а эритроциты кошки – в эхиноциты.

Литература

1. Александрова Д.И. Сравнительное исследование чувствительности предварительно обезвоженных эритроцитов человека и быка к гипертоническому стрессу / Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Пробл. криобиологии. – 2007.– Т. 17, № 4.– С. 327–334
2. Бабийчук Л.А. Конформационные изменения эритроцитов под влиянием криопротектора ПЭО-1500 / Л.А. Бабийчук // Проблемы криобиологии. – 1997. – № 1-2. – С. 95-99.
3. Биология и гигиена животных, качество и безопасность продукции животноводства: материалы XIII международно научно – практичной конференции [Проблемы ветеринарной медицины, качества и безопасности продукции животноводства].- К.: Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, 2014. – 235 с.
4. Кулешова Л.Г. Изучение кинетики взаимодействия эритроцитов человека с криопротекторами и солями / Л.Г. Кулешова, Л.Ф. Розанов // Криобиология и криомедицина.– 1980.– № 7. – С. 40–44.
5. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике: Методы гематологических исследований. – М.: Медицина, 1987. – 363 с.

6. Морфо-функциональное состояние эритроцитов, криоконсервированных с глицерином и поливинилпирролидоном, на протяжении 5 дней хранения при 4 ± 2 °C / М.М. Петров, О.В. Кушко, Л.Н. Блоцкая [и др.] // Криобиология и криомедицина. – 1980. – Вып. 6. – С. 50-53.
7. Bessis M. Living Blood cells and their Ultrastructure.- Berlin: Springer-1973.
8. Christopher M , Lee SE . Red cell morphologic alterations in cats with hepatic disease // Vet Clin Pathol. - 1994; 23 : P. 7–12.
9. Jaroszynski W. Effect of hydroxyethyl starch (HAES) on degree and kinetics of erythrocyte aggregation studied with dielectric spectroscopy method / Jaroszynski W., Keslinka E., Wujtewicz M. // Med Sei Monit. - 2002; 8 (7). - P.272-278.
10. Jay A. W. Geometry of the human erythrocyte. I. Effect of albumin on cell geometry // Biophys. J. – 1975, V. 15(3). - P. 205-222.
11. Kim H. A comparative study of the effects of glycerol and hydroxyethyl starch in canine red blood cell cryopreservation / Kim H., Tanaka S., Une S. Y. // J Vet Med Sci. 2004 Dec; 66(12):1543-1547.

MORFOLOGICAL CHANGES OF ERYTHROCYTES CATS AND DOGS ON THE STAGES CRYOPRESERVATION

Pervushina O.A.*, post graduate student, Zhegunov G. F.*, sc.D. professor,
Pashomova.U** candidate boil.science

*Kharkiv State Zooveterinary Academy, Kharkiv, Ukraine

**Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine

Summary. Morphological changes erythrocytes dogs and cats before and after freeze-thawing of cryoprotective solutions containing 10% DMSO, 17.5% of HES and 7.5% glycerol +12.5% HES has been studied by light microscopy. It was shown, that the dog erythrocytes after freezing-thawing under the influence of DMSO transformed into sferohinotsity and erythrocytes cats - in echinocytes. Solutions HES and 7.5% glycerol + 12.5% HES after thawed and washed cause erythrocytes formation of deformed cells of irregular shape.

Key words: red blood cells, hemolysis, dimethyl sulfoxide, hydroxyethyl starch, cryopreservation, morphology, transformation.

УДК: 636.52/. 58.087:612.74:577.124

КЛЮЧОВІ ФЕРМЕНТИ ГЛІКОЛІЗУ ТА РЕГУЛЯЦІЯ ЇХ АКТИВНОСТІ

Приходченко В.О., к.с.-г.н., доцент, vita.prihodchenko@mail.ru
Харківська державна зооветеринарна академія, м. Харків

Анотація. У статті наведені літературні данні про характеристики інтенсивності протікання гліколізу та його координація зі швидкостями інших метаболічних процесів, у першу чергу гліуконеогенезу та циклу трикарбонових кислот, а також значення анаеробного окиснення для продуктивності сільськогосподарських тварин.

Ключевые слова: гліколіз, фосфофруктокіназа, альдолаза.

Основним катаболітичним процесом деструкції глюкози в клітинах тварин та птиці є послідовність ряду реакцій її окиснення, у результаті яких в анаеробних умовах глюкоза перетворюється на лактат, а в аеробних – на кінцеві продукти CO_2 та воду. Біологічною значимістю окисних перетворень глюкози є виділення енергії, яка здатна трансформуватися в хімічну енергію молекул АТФ, у тому числі за анаеробних умов, а також утворення в процесі катаболізму глюкози проміжних метаболітів, які використовуються клітинами як структурні попередники для синтезу амінокислот, стероїдів, азотистих основ, ліпідів тощо [4, 7].

Гліколіз – це послідовність десяти ферментативних реакцій, за результатом яких в аеробних умовах глюкоза розпадається до двох молекул пірувату (аеробний гліколіз), а в анаеробних – до двох молекул лактату (анаеробний гліколіз).

Розділ на анаеробний та аеробний гліколіз є умовним, оскільки реакції гліколізу в присутності та відсутності кисню є однаковими. Різниця лише в їх швидкості та кінцевих продуктах. При нестачі кисню реокиснення НАДН, що утворився у ході гліколізу, відбувається шляхом спряження