

УДК 612.111:615.014.41:547.42

UDC 612.111:615.014.41:547.42

**Криоконсервирование эритроцитов животных под защитой
диметилсульфоксида, полиэтиленоксида, глицерина**О.Н. ДЕНИСОВА¹, Г.Ф. ЖЕГУНОВ¹, Л.А. БАБИЙЧУК²¹Харьковская государственная зооветеринарная академия²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков**Cryopreservation of Animal's Erythrocytes under Dimethyl Sulfoxide,
Polyethylene Oxide and Glycerol Protection**O.N. DENISOVA¹, G.F. ZHEGUNOV¹, L.A. BABIICHUK²¹Kharkov State Veterinary Academy²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy
of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Проведены исследования по криоконсервированию эритроцитов лошади, быка, собаки под защитой проникающих и непроникающих криопротекторов. Выявлено, что криопротекторы ДМСО и ПЭО-1500 являются достаточно эффективными для криоконсервирования эритроцитов исследуемых животных.

Ключевые слова: эритроциты быка, коня, собаки, криоконсервирование, ПЭО-1500, глицерин, ДМСО.

Проведено дослідження по заморожуванню еритроцитів коня, собаки, бика під захистом проникаючих та непроникаючих криопротекторів. Встановлено, що криопротектори ДМСО та ПЕО-1500 є достатньо ефективними для криоконсервування еритроцитів досліджуваних тварин.

Ключові слова: еритроцити бика, коня, собаки, криоконсервування, ПЕО-1500, гліцерин, ДМСО.

Researches on cryopreservation of equine, bovine and canine erythrocytes with penetrative and non-penetrative cryoprotectants were carried-out. DMSO and PEO-1500 were revealed to be quite efficient for erythrocyte cryopreservation of animals under study.

Key-words: bovine, equine, canine erythrocytes, cryopreservation, PEO-1500, glycerol, DMSO.

В повседневной практике ветеринары часто проводят различные трансфузиологические операции. В частности, переливание крови применяют при острых кровопотерях, состояниях миелодепрессии с анемией, острых отравлениях гемолитическими ядами, уремии. Поэтому необходим определенный запас донорской крови.

Цельная кровь при положительных температурах (2-6°C) сохраняется ограниченное время. Функциональная активность клеток крови при использовании раствора "Глюгидир" снижается к концу третьей недели хранения в результате истощения содержания ферментов, ответственных за поддержание метаболических процессов. При добавлении метаболитов углеводно-фосфорного обмена полноценные эритроциты сохраняются 30-35 дней [5], но по истечении этого срока морфофункциональные свойства эритроцитов ухудшаются. Поэтому запасы донорской крови животных можно создать лишь при длительном хранении клеток в замороженном состоянии.

В настоящее время существуют методы криоконсервирования клеток крови человека, позволяющие хранить ее долгое время. Разработка

Different transfusive operations are frequent in the veterinary routine practice. In particular, blood transfusion is applied at an acute blood loss, myelodepression states with anemia, acute poisoning with hemolytic venoms, uremia. Therefore a certain stock for donor's blood is indispensable.

Under positive temperatures (2-6°C) the whole blood is preserved for a limited time. Functional activity of blood cells when using "Glygicir" solution decreases to the end of third storage week as a result of exhausting of enzyme content, responsible for metabolic processes maintenance. When adding metabolites of carbohydrate-phosphorus metabolism the integral erythrocytes are preserved within 30-35 days [5], but after that erythrocyte morphofunctional properties are getting worse. Therefore the stocks of animal donor blood can be created only when storing cells for a long time in frozen state.

Nowadays there are the methods for human blood cell cryopreservation, enabling its long-term storage. The elaboration of such methods of blood storage for animals will enable the blood bank creation, the preservation of blood cell integrity and their usage for treating different diseases.

Адрес для корреспонденции: Бабийчук Л.А., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-01-26, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Babijchuk L.A., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 0126, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

таких методов хранения крови для животных позволит создать банк крови, сохранить полноценность клеток крови и использовать их для лечения различных заболеваний.

Цель работы – экспериментальный подбор криопротекторов и условий криоконсервирования эритроцитов, разработка методов замораживания крови животных для дальнейшего создания банка крови млекопитающих.

Материалы и методы

Объект исследований – эритроциты лошади, быка, собаки, человека. В работе применяли полиэтиленоксид молекулярной массой 1500 (ПЭО-1500), глицерин, диметилсульфоксид (ДМСО).

Использовали криоконсерванты.

1. ЦНИИГПК 11₄: 4 % маннита; 0,7% NaCl; 0,03% Na₂HPO₄×12H₂O; 30% глицерина.
2. 20%-й ДМСО; 150 mM NaCl; 10 mM фосфатного буфера (pH 7,4).
3. 30%-й ПЭО; 150 mM NaCl; 10 mM фосфатного буфера (pH 7,4).

Криоконсерванты добавляли к эритроцитам в соотношении 1:1, замораживали до –196°C погружением контейнера в жидкий азот. Отогрев после хранения производили в водяной бане 42–45°C.

Проникающие криопротекторы (глицерин и ДМСО) удаляли из эритроцитов методом последовательного центрифугирования. После оттаивания к эритроцитам при постоянном помешивании медленно добавляли отмывочные сахарозно-солевые или солевые растворы.

Для первого отмывания (соотношение 1:1) брали: 30,0 г сахарозы; 0,7 г NaCl; 10 mM фосфатного буфера; до 100 мл дистиллированной воды или 0,6 M NaCl; 10 mM фосфатного буфера. После тщательного перемешивания взвесь центрифугировали. Супернатант удаляли.

Для второго отмывания (соотношение 1:1) использовали: 10,0 г сахарозы; 0,7 г NaCl; 10 mM фосфатного буфера; до 100 мл дистиллированной воды или 0,15 M NaCl; 10 mM фосфатного буфера. После тщательного перемешивания взвесь центрифугировали. Супернатант удаляли.

Для третьего отмывания (соотношение 1:1) брали: 5,0 г сахарозы; 0,9 г NaCl; 10 mM фосфатного буфера; до 100 мл дистиллированной воды или 0,15M NaCl; 10mM фосфатного буфера. После тщательного перемешивания взвесь центрифугировали. Супернатант удаляли.

Показателем устойчивости клеток служил гемолиз, который определяли согласно [4].

Моделирование трансфузии осуществляли переносом суспензии эритроцитов в изотоническую среду (150 mM NaCl). Разведение эритроцитов составляло 1:10, инкубацию проводили при 37°C в течение часа.

The work aim was to experimentally select cryoprotectants and conditions for erythrocyte cryopreservation, to elaborate the methods of animal blood freezing for further mammalian blood bank creation.

Materials and methods

The investigation object was the equine, bovine, canine and human erythrocytes. Polyethylene oxide with 1500 molecular mass (PEO-1500), glycerol and dimethyl sulfoxide (DMSO) were applied in the research.

The following cryopreservatives were used:

1. Central R&D Institute of Hematology and Blood Transfusion (CRDIHBT) 11₄: 4% mannitol; 0.7% NaCl; 0.03% Na₂HPO₄×12H₂O; 30% glycerol.
2. 20% DMSO, 150 mM NaCl; 10mM phosphate buffer (pH 7.4).
3. 30%PEO; 150mM NaCl; 10 mM phosphate buffer (pH 7.4).

Cryopreservatives were added to erythrocytes in 1:1 ratio, frozen down to –196°C by immersing container into liquid nitrogen. Thawing after storage was done on 42–45°C water bath.

Penetrative cryoprotectants (glycerol and DMSO) were removed out of erythrocytes by the method of successive centrifugation. After thawing the washing-out sucrose-saline or saline solutions were slowly added to erythrocytes at a constant mixing.

The first washing-out (1:1 ratio) comprised 30.0 g sucrose; 0.7 g NaCl; 10 mM phosphate buffer; up to 100 ml distilled water or 0.6 M NaCl; 10 mM phosphate buffer. After a thorough mixing the suspension was centrifuged. The supernatant was removed.

For the second washing-out (1:1 ratio) we used 10.0 g sucrose; 0.7 g NaCl; 10 mM phosphate buffer; up to 100 ml distilled water or 0.15 M NaCl; 10 mM phosphate buffer. After thorough mixing the suspension was centrifuged. The supernatant was removed.

For the third washing-out (1:1 ratio) it was 5.0 g sucrose; 0.9 g NaCl; 10 mM phosphate buffer; up to 100 ml distilled water or 0.15 M NaCl; 10 mM phosphate buffer. After thorough mixing the suspension was centrifuged. The supernatant was removed.

The index of cell resistance, i.e hemolysis was determined as reported [4].

Transfusion modelling was carried-out by transferring erythrocyte suspension into isotonic medium (150 mM NaCl). Erythrocyte dilution made 1:10, the incubation was performed at 37°C for an hour.

The data were statistically processed with “Stat Graphics Plus” Software. Number of experiments in each series was above five.

Results and discussion

Nowadays there are different variants for human donor blood cell cryopreservation. The most spread

Статистическую обработку данных осуществляли по программе "Stat Graphics Plus". Количество экспериментов в каждой серии опытов было пять и более.

Результаты и обсуждение

В настоящее время существуют различные варианты криоконсервирования клеток донорской крови человека. Наиболее распространен в практике низкотемпературных банков нашей страны метод криоконсервирования эритроцитов с ограждающим раствором ЦНИИГПК 11₄ [1], основу которого составляет глицерин в конечной концентрации 15% в сочетании с экзоцеллюлярным защитным веществом (маннитом). Криоконсервант добавляли к клеточной массе в соотношении 1:1. Данный метод позволяет сохранить до 80% эритроцитов человека. Глицерин, хорошо проникающий в эритроциты человека и создающий в них условия гиперосмолярности, необходимо удалять после оттаивания клеток до их инкубации в изотонической среде во избежание набухания и лизиса клеток. Метод отмывания основан на принципе постепенного разведения эритроцитов, содержащих глицерин, гипертоническими растворами непроникающих в клетку веществ. Осмотическая активность понижается при уменьшении концентрации внутриклеточного глицерина.

Проведенные исследования показали, что процент гемолиза эритроцитов человека при удалении глицерина сахарозно-солевыми и солевыми растворами соответственно составляет 16,09 и 18,8%; для эритроцитов собаки – 64,2 и 53,95%, быка – 77,68 и 89,3%, лошади – 65,4 и 78,38% (рис. 1). По-видимому, данный криопротектор не проникает или проникает слабо через мембрану клеток исследуемых животных.

Поскольку глицерин как криопротектор не дал положительного результата при криоконсервировании, был использован ДМСО, который лучше, чем глицерин, проникает в эритроциты [3], но в высоких концентрациях он разрушает клетку. Поэтому выбрана его 10%-я конечная концентрация. Экспериментально установлено оптимальное время инкубации с криопротектором (в минутах) до замораживания для полного проникновения ДМСО в эритроциты исследуемых животных: для эритроцитов лошади – 15, быка – 60, собаки – 75. По данным [3] для эритроцитов человека равновесие достигается через 15 мин.

На рис. 2, а представлены результаты гемолиза после замораживания-отогрева эритроцитов млекопитающих с ДМСО. Разница заметна после удаления криопротектора из эритроцитов быка сахарозно-солевыми и солевыми отмывочными

методом в практике низкотемпературных банков в нашей стране – это метод криоконсервирования эритроцитов с раствором CRDIHBT 11₄ ограниченной концентрации [1], основанный на глицерине в 15% конечной концентрации вместе с экзоцеллюлярным защитным веществом (маннитол). Криоконсервант добавляли к клеточной массе в соотношении 1:1. Этот метод позволяет сохранять до 80% эритроцитов человека. Глицерин, хорошо проникающий в эритроциты человека и создающий в них условия гиперосмолярности, необходимо удалять после оттаивания клеток до их инкубации в изотонической среде во избежание набухания и лизиса клеток. Метод отмывания основан на принципе постепенного разведения эритроцитов, содержащих глицерин, гипертоническими растворами непроникающих в клетку веществ. Осмотическая активность понижается при уменьшении концентрации внутриклеточного глицерина.

Наше исследование показало, что процент гемолиза эритроцитов человека при удалении глицерина сахарозно-солевыми и солевыми растворами соответственно составляет 16,09 и 18,8%, соответственно; 64,2 и 53,95% для эритроцитов собаки; 77,68 и 89,3% для эритроцитов быка; 65,4 и 78,38% для эритроцитов лошади (рис. 1). По-видимому, данный криопротектор не проникает или слабо проникает через мембрану клеток исследуемых животных.

Поскольку глицерин как криопротектор не дал положительного результата при криоконсервировании, был использован ДМСО, который лучше, чем глицерин, проникает в эритроциты [3], но в высоких концентрациях он разрушает клетку. Поэтому выбрана его 10%-я конечная концентрация. Экспериментально установлено оптимальное время инкубации с криопротектором (в минутах) до замораживания для полного проникновения ДМСО в эритроциты исследуемых животных: для эритроцитов лошади – 15, быка – 60, собаки – 75. По данным [3] для эритроцитов человека равновесие достигается через 15 мин.

На рис. 2, а представлены результаты гемолиза после замораживания-отогрева эритроцитов млекопитающих с ДМСО. Разница заметна после удаления криопротектора из эритроцитов быка сахарозно-солевыми и солевыми отмывочными

методом в практике низкотемпературных банков в нашей стране – это метод криоконсервирования эритроцитов с раствором CRDIHBT 11₄ ограниченной концентрации [1], основанный на глицерине в 15% конечной концентрации вместе с экзоцеллюлярным защитным веществом (маннитол). Криоконсервант добавляли к клеточной массе в соотношении 1:1. Этот метод позволяет сохранять до 80% эритроцитов человека. Глицерин, хорошо проникающий в эритроциты человека и создающий в них условия гиперосмолярности, необходимо удалять после оттаивания клеток до их инкубации в изотонической среде во избежание набухания и лизиса клеток. Метод отмывания основан на принципе постепенного разведения эритроцитов, содержащих глицерин, гипертоническими растворами непроникающих в клетку веществ. Осмотическая активность понижается при уменьшении концентрации внутриклеточного глицерина.

растворами. В эритроцитах лошади и собаки различий меньше, а в эритроцитах человека они практически отсутствуют. Для моделирования трансфузии эритроцитов необходимы температура 37°C и изотоническая среда. Моделирование проводили в течение часа. Такие условия соответствуют физиологическим показателям в кровеносном русле реципиента, что позволяет судить о степени приживаемости клеток. При моделировании трансфузии процент гемолиза этих клеток у всех исследуемых животных небольшой (рис. 2, б). Следовательно, ДМСО защищает эритроциты данных видов животных при замораживании лучше, чем глицерин.

Для эритроцитов человека разработаны методы криоконсервирования под защитой непроницающего криопротектора ПЭО-1500, который не требует удаления из размороженных клеток. Это значительно упрощает получение качественных деконсервированных клеток, пригодных для практического применения. На основании этого мы также использовали ПЭО-1500 в конечной концентрации 15% для криоконсервирования эритроцитов исследуемых животных. Результаты проведенных экспериментов (рис. 3, а) показали незначительный гемолиз эритроцитов млекопитающих сразу после размораживания (0,5-2%). Однако при моделировании трансфузии, т. е. переносе размороженных эритроцитов в изотоническую среду, наблюдается значительный гемолиз вследствие повреждения наименее устойчивых эритроцитов (рис. 3, б). Наиболее осмотически устойчивыми являются эритроциты

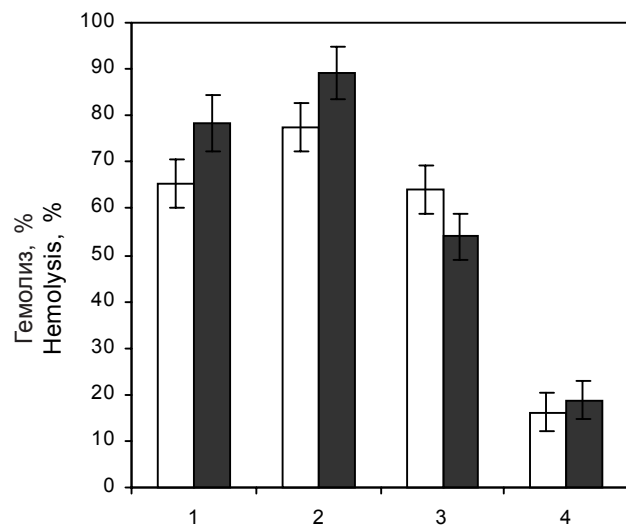


Рис. 1. Процент гемолиза эритроцитов, замороженных под защитой криоконсерванта ЦНИИГПК 11₄: 1 – лошадь; 2 – бык; 3 – собака; 4 – человек; □ – отмывание сахарозно-солевыми растворами; ■ – отмывание солевыми растворами. Результаты представлены в виде $M \pm m$, $n=5$.

Fig. 1. Hemolysis percentage of erythrocytes, frozen under CRDINHBT 11₄ protection: 1 – horse; 2 – bull; 3 – dog; 4 – human; □ – washing-out with sucrose-saline solutions; ■ – washing-out with saline solutions. Results are shown in $M \pm m$, $n=5$.

suitable for practical application. Based on this fact we used PEO-1500 in 15% final concentration for erythrocyte cryopreservation of animals under study as well. The results of experiments performed (Fig. 3, a) demonstrated a slight hemolysis of mammalian erythrocytes just after freeze-thawing (0.5-2%). However when modelling transfusion, i.e. the frozen-

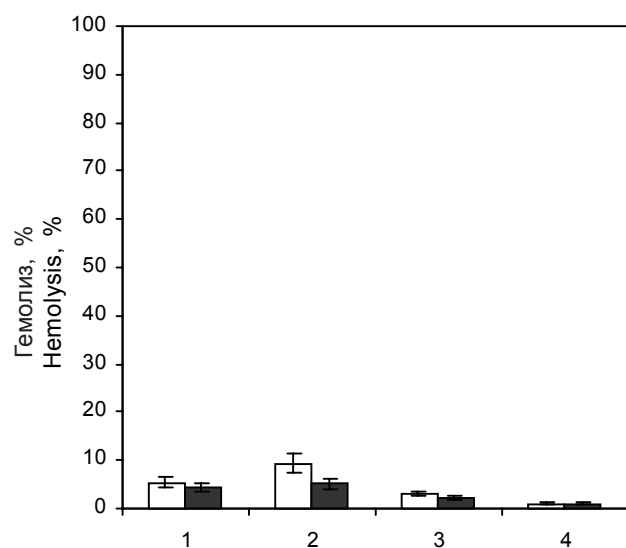
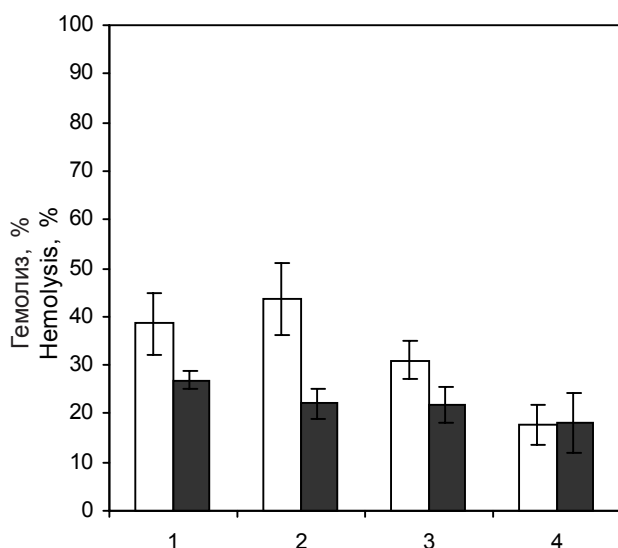


Рис. 2. Уровень гемолиза эритроцитов, замороженных под защитой ДМСО: а – после размораживания и отмывания; б – моделирования трансфузии; 1 – лошадь; 2 – бык; 3 – собака; 4 – человек; □ – отмывание сахарозно-солевыми растворами; ■ – отмывание солевыми растворами. Результаты представлены в виде $M \pm m$, $n=8$.

Fig. 2. Hemolysis level of erythrocytes, frozen under DMSO protection: a – after freeze-thawing and washing-out; b – after transfusion modelling; 1 – horse; 2 – bull; 3 – dog; 4 – human; □ – washing-out with sucrose-saline solutions; ■ – washing-out with saline solutions. Results are shown in $M \pm m$, $n=8$.

человека [2]. Гемолиз эритроцитов лошади после их переноса в среды с изотонической тоничностью также невелик и составляет порядка 25%. Более значительное повреждение наблюдается в эритроцитах быка и собаки.

Полученные отличия в устойчивости эритроцитов различных видов животных к криоконсервированию могут быть связаны с особенностями строения их мембран. При этом на устойчивость эритроцитов к низкотемпературному воздействию оказывают влияние как белковые, так и липидные компоненты мембраны. Согласно данным работ [6, 7, 9] в мембране эритроцитов быка фосфатидилхолин отсутствует полностью или содержится в следовых количествах, а в эритроцитах собаки, лошади, человека – 46,9; 42,4; 29,3% соответственно. Соотношение фосфатидилхолина к сфингомиелину – один из факторов, определяющих текучесть мембраны. В работе [11] установлено, что эритроциты с низким соотношением этих липидов повреждаются меньше в присутствии катионных пептидов, чем мембраны с высоким их соотношением. Отношение этих фосфолипидов у исследуемых животных следующее: лошадь – 3,141; собака – 4,343; человек – 1,149. В эритроцитах этих животных молярное соотношение холестерина к фосфолипидам различно: для человека – примерно 0,8; быка и лошади – 0,92; собаки – 0,96.

Сейчас известно, что важную роль в устойчивости клеток к экстремальным воздействиям, в том числе и низким температурам, играют белки мембраны и цитоскелета. На основании сравнения состава белков мембран эритроцитов различных

thawed erythrocyte transferring into isotonic medium, a considerable hemolysis due to a damage of less resistant erythrocytes is observed (Fig. 3, b). Human erythrocytes are the most osmotically resistant ones [2]. Hemolysis of equine erythrocytes after their transfer into the media with isotonic tonicity is also low and makes about 25%. Most considerable damage is observed in bovine and canine erythrocytes.

The obtained differences in erythrocyte resistance of different animals to cryopreservation can be related to the peculiarities of their membrane structure. At the same time both protein and lipid membrane components affect the erythrocyte resistance to low temperature effect. As reported in the papers [6, 7, 9] in the membrane of bovine erythrocytes phosphatidylcholine is completely absent or is in trace amounts, but in canine, equine and human erythrocytes it is 46.9; 42.4; 29.3%, correspondingly. The ratio of phosphatidylcholine to sphingomyelin is one of the factors, determining the membrane fluidity. In the paper [11] it was revealed, that erythrocytes with a low ratio of these lipids were less damaged at the presence of cation peptides than membranes with their high ratio. The ratio of these phospholipids in the studied animals is as follows: 3.141 for horse, 4.343 for dog and 1.149 for human. In erythrocytes of these animals a molar ratio of cholesterol to phospholipids is different: it is approximately 0.8 for human; 0.92 for bull and horse; 0.96 for dog.

Now it is known that the membrane and cytoskeletal proteins are very important in a cell resistance to extreme effects, including low temperatures. Based on the comparison of erythrocyte membrane protein composition in different animals using electrophoresis

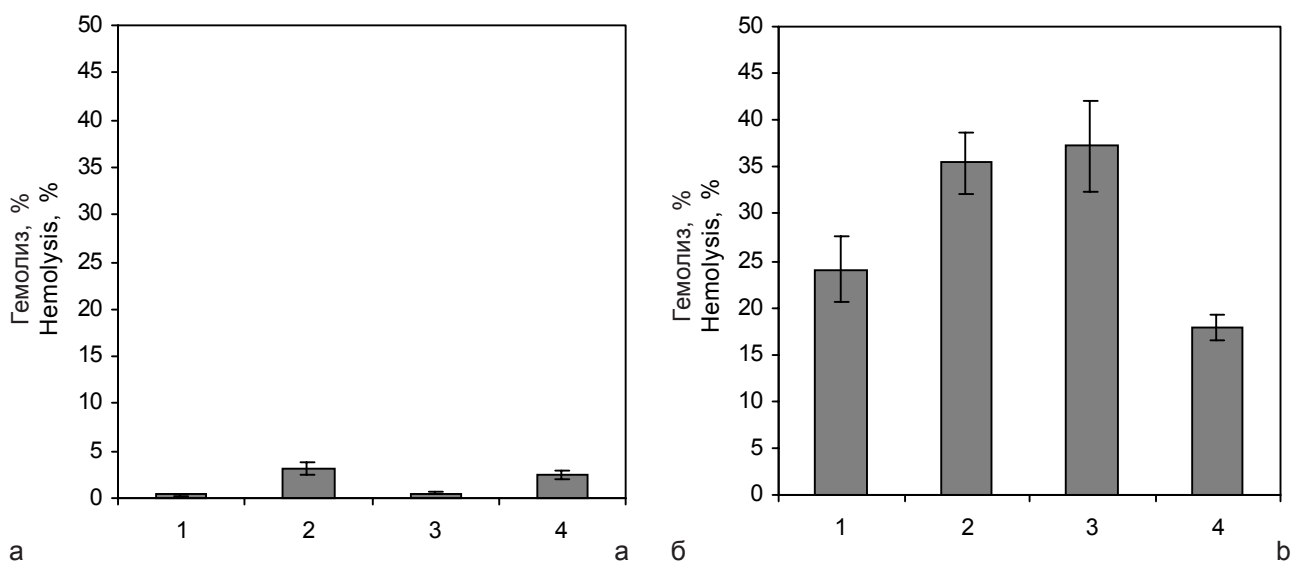


Рис. 3. Уровень гемолиза эритроцитов, криоконсервированных с ПЭО-1500: а – после размораживания; б – моделирования трансфузии; 1 – лошадь; 2 – бык; 3 – собака; 4 – человек. Результаты представлены в виде $M \pm m$, $n = 6$.

Fig. 3. Hemolysis level of erythrocytes, cryopreserved with PEO-1500: a – after freeze-thawing; b – after transfusion modelling; 1 – horse; 2 – bull; 3 – dog; 4 – human. Results are shown in $M \pm m$, $n = 6$.

видов животных с помощью электрофореза [8] можно сделать вывод: при общей картине мембранных белков у всех видов исследуемых млекопитающих имеются отличия. Так, основные мембранные белки, включающие полосы 1, 2, 3 и 5, присутствуют в эритроцитах лошади, быка, собаки и человека, но в эритроцитах быка для белка полосы 3 (анионный обменник) характерна молекулярная масса выше (100 кДа). Эритроциты быка, собаки и человека имеют отдельные полосы 4.1 и 4.2, в эритроцитах лошади обнаружен дефицит белка полосы 4.2, который является важным компонентом в стабилизации клеток [10]. Однако в эритроцитах лошади в большом количестве присутствуют белки полос 4.5 и 4.9. Следует отметить, что в работе [8] наибольшие различия на электрофореграммах были обнаружены в области белков полосы 4.5 и ниже белка полосы 7, которые идентифицируются как составные компоненты системы транспорта воды плазматической мембраны. Эти различия в составе белков, вовлеченных в водную диффузию, по мнению авторов [8], обуславливают различия в проницаемости воды, обнаруженные ранее для различных видов животных, что может влиять на устойчивость эритроцитов к криоконсервированию.

Выводы

Криоконсервирование эритроцитов исследуемых животных под защитой консерванта ЦНИИГПК 11₄ (достаточно эффективного для замораживания эритроцитов человека) не дало положительного результата.

Метод криоконсервирования эритроцитов млекопитающих с ДМСО эффективно сохраняет клетки после размораживания и переноса в изотонические условия.

Криоконсервирование с ПЭО-1500 также позволяет сохранить клетки после размораживания. Однако при переносе эритроцитов быка и собаки в среду физиологической тоничности наблюдается значительное повреждение этих клеток.

Литература

1. Аграненко В.А., Федорова Л.И. Замороженная кровь и её клиническое применение. – М.: Медицина, 1983. – 96 с.
2. Бабийчук Л. А. Механизмы температурно-осмотической стабилизации эритроцитов при охлаждении и замораживании в присутствии непроницающего криопротектора: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. – Харьков, 2002. – 24 с.
3. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. – Киев: Наук. думка, 1994. – 432 с.

[8] we can conclude as follows: at a common picture of membrane proteins there are certain differences in all studied mammals. Thus, all main membrane proteins, including those for band 1, 2, 3 and 5 are present in equine, bovine, canine and human erythrocytes, but in bovine ones the higher molecular mass (100 kDa) is typical for band 3 protein (anion exchanger). Bovine, canine and human erythrocytes have separated 4.1 and 4.2 bands, in the equine ones there was found out the band 4.2 protein lack, which is an important component in cell stabilisation [10]. However in equine erythrocytes the band 4.5 and 4.9 proteins are present in a big amount. Of note is that in the paper [8] the most differences in electrophoregrams were revealed in band 4.5 protein area and below band 7 protein, which are identified as the components of water transport system of plasmatic membrane. The authors believe [8] that these differences in composition of proteins, involved in water diffusion, stipulate the differences in water permeability, revealed earlier for different animals, that can affect the erythrocyte resistance to cryopreservation.

Conclusions

Cryopreservation of studied animals' erythrocyte under CRDIHBT 11₄ preservative protection (quite efficient for human erythrocyte freezing) was unsuccessful.

Method of mammalian erythrocyte cryopreservation with DMSO efficiently preserves cells after freeze-thawing and transfer into isoosmotic conditions.

Cryopreservation with PEO-1500 also enables cell preservation after freeze-thawing. However when transferring bovine and canine erythrocytes into the medium with physiological tonicity a considerable damage in these cells is observed.

References

1. Agranenko V.A., Fedorova L.I. Frozen blood and its clinical application. – Moscow: Meditsina, 1983. – 96 p.
2. Babijchuk L.A. Mechanisms of temperature-osmotic erythrocyte stabilisation during cooling and freezing at the presence of non-penetrative cryoprotectant: Author's abstract of thesis for doctor's degree obtaining (biology). – Kharkov, 2002. – 24 p.
3. Belous A.M., Grischenko V.I. Cryobiology. – Kiev: Naukova Dumka, 1994. – 432 p.
4. Derviz G.V., Byalko N.K. Specification of the method of haemoglobin determination, dissoluble in blood plasm // Lab. delo. – 1966. – N8. – P. 461-464.
5. Mokeev I.N. Infusion-transfusion therapy: Reference book. – Moscow, 1998. – 232 p.
6. Chernitsky E.A., Vorobej A.B. Structure and function of erythrocyte membrane. – Minsk: Nauka i tekhnika, 1981. – 213 p.
7. Florin-Christensen J., Suarez C.E., Florin-Christensen M. et al. A unique phospholipid organization in bovine erythrocyte membranes // PNAS Biochemistry. – 2001. – Vol. 98, N14. – P. 7736-7741.

4. Дервиз Г. В., Бялко Н. К. Уточнение метода определения гемоглобина, растворенного в плазме крови // Лаб. дело. – 1966. – №8. – С.461-464.
5. Мокеев И. Н. Инфузионно-трансфузионная терапия: Справочник. – М., 1998. – 232 с.
6. Черницкий Е.А., Воробей А.Б. Структура и функция эритроцитарных мембран. – Минск: Наука и техника, 1981. – 213 с.
7. Florin-Christensen J., Suarez C. E., Florin-Christensen M. et al. A unique phospholipid organization in bovine erythrocyte membranes // PNAS Biochemistry. – 2001. – Vol. 98, N14. – P. 7736-7741.
8. Matei H., Frentescu L., Benga Gh. Comparative studies of the protein composition of red blood cell membranes from eight mammalian species // J.Cell.Mol.Med.– 2000.– Vol. 4, N4.– P. 270-276.
9. Nouri-Sorkhabi M. H., Agar N. S., Sullivan D. R. et al. Phospholipid composition of erythrocyte membranes and plasma of mammalian blood including Australian marsupials; quantitative 31P NMR analysis using detergent // Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.– 1996.– Vol. 113, N2.– P. 221-227.
10. Oguz K. Baskurt, Robert A. Farley, Herbert J. Meiselman. Erythrocyte aggregation tendency and cellular properties in horse, human and rat: a comparative study // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 1997.– Vol. 273.– P. H2604- H2612.
11. Oyewale J.O. Changes in osmotic resistance of erythrocytes of cattle, pigs, rats and rabbits during variation in temperature and pH // Zentralbl. Veterinarmed. A.– 1992.– Vol. 39, N2.– P. 98-104.

Accepted in 22.02.05.

Поступила 22.02.05