

## Криоконсервирование эритроцитов и клеток костного мозга домашних животных

Г.Ф. Жегунов<sup>1</sup>, О.Н. Денисова<sup>1</sup>, Л.А. Водопьянова<sup>1</sup>, Л.А. Бабичук<sup>2</sup>, Н.Г. Землянских<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Харьковская государственная зооветеринарная академия

<sup>2</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Cryopreservation of Erythrocytes and Bone Marrow Cells of Domestic Animals

G.F. ZHEGUNOV<sup>1</sup>, O.N. DENISOVA<sup>1</sup>, L.A. VODOPYANOVA<sup>1</sup>, L.A. BABIYCHUK<sup>2</sup>, N.G. ZEMLYANSKIKH<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kharkov Zooveterinary Institute

<sup>2</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine  
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Исследовали действие различных криопротекторов и замораживания-отогрева на клетки костного мозга и эритроциты домашних животных. Показано, что замораживание-отогрев без криопротекторов существенно повреждает клетки и делает их негодными для трансфузии. Установлено, что наиболее эффективным криопротектором для эритроцитов лошади, быка, собаки оказался ДМСО, который не только обеспечивает приемлемый уровень потери клеток после замораживания-отогрева, но и сохраняет осмотическую устойчивость клеток. Глицерин и ПЭО-400 оказались менее эффективными. Установлено, что в условиях замораживания до  $-196^{\circ}\text{C}$  эритроцитов экспериментальных животных ПЭО-1500 обеспечивает сохранность клеток  $\sim 95\%$ , ДМСО  $\sim 75\%$ , а глицерин – менее 25% (в зависимости от видовой принадлежности клеток).

Оценка проницаемости мембран для криопротекторов показала, что более высокая криозащитная эффективность ДМСО по сравнению с глицерином согласуется с его более высокой проникающей способностью. Эритроциты, криоконсервированные с ДМСО, проявляют высокую устойчивость в модели трансфузии (сохранность  $\sim 90\text{--}95\%$ ) с сохранением осмотической хрупкости на уровне контроля. При сравнении исследованных клеток животных эритроциты лошади оказались менее устойчивыми к криоконсервированию под защитой криопротекторов и осмотическим изменениям среды, а эритроциты собаки – наиболее устойчивыми. Криоконсервирование эритроцитов млекопитающих с ДМСО позволяет сохранить содержание АТФ и 2,3-ДФГ на уровне контроля, а после замораживания клеток под защитой ПЭО-1500 наблюдается достоверное снижение концентрации данных метаболитов через 24 ч в модели трансфузии.

Установлено, что сохранность клеток костного мозга собак, замороженных в жидком азоте без криопротекторов, очень мала, что подтверждает необходимость использования криозащиты. Все использованные криопротекторы проявили защитное действие, сохраняя до 70% клеток костного мозга собак. Наиболее эффективным был ДМСО, обеспечивающий наибольшую сохранность клеток после криоконсервирования (до 90%). Недифференцированные клетки костного мозга, замороженные под защитой криопротекторов, имеют почти 100%-ю сохранность. Немного меньше этот показатель у ретикулярных клеток, промиелоцитов и клеток лимфоцитарного ряда. Большой спектр клеток костного мозга после криоконсервирования сохраняется под защитой ДМСО в 7 и 10%-й концентрации и ПЭО-400. Слабую стойкость к криоконсервированию, даже под защитой использованных криопротекторов, имеют полихроматофильные эритроциты и оксифильные нормоциты. Клетки мегакариоцитарного ряда не сохраняются вообще. Сегментоядерные клетки и макрофаги сохраняются только в присутствии 7 и 10%-го ДМСО. Процессы инкубации и замораживания-оттаивания приводят к снижению количества гликогена в клетках костного мозга собак. Наибольшее количество гликогена сохранялось после криоконсервирования с 7 и 10%-м ДМСО, 10 и 15%-м ПЭО-400.

The effect of different cryoprotectants and freeze-thawing on domestic animal bone marrow cells and erythrocytes was investigated. It has been shown that freeze-thawing without cryoprotectants highly damages cells and makes them unsuitable for transfusion. It has been established that the most efficient cryoprotectant is DMSO for equine, bovine, canine erythrocytes, providing not only proper level of cell loss after freeze-thawing, but preserves the osmotic cell resistance. Glycerol and PEO-400 are less effective. It has been established that under freezing conditions down to  $-196^{\circ}\text{C}$  of experimental animal erythrocytes PEO-1500 provides 95% cell survival, 75% DMSO and less than 25% glycerol (according to cell specificity).

Membrane penetration evaluation for cryoprotectants has shown, that most high cryoprotective DMSO efficiency in comparison with glycerol confirms with its higher penetration ability. Erythrocytes cryopreserved with DMSO, exhibit high resistance in transfusion model (90–95% integrity) with preservation of osmotic fragility at the control level. When comparing the investigated animal cells the equine erythrocytes were less resistant to cryopreservation under protection of cryoprotectants and osmotic changes of media, but canine erythrocytes were the most resistant. The cryopreservation of mammalian erythrocytes with DMSO enables to preserve the ATP and 2,3-DPG content at the control level, but after cell freezing under PEO-1500 protection the significant decreasing of concentration of these metabolites in 24 hrs in transfusion model is observed.

It has been established that cell integrity of canine bone marrow, frozen in liquid nitrogen without cryoprotectants, is very low, that confirms the application necessity of cryoprotection. All used cryoprotectants exhibited the protective activity, preserving up to 70% cells of canine bone marrow. The most effective was DMSO, providing the highest cell integrity after cryopreservation (up to 90%). The nondifferentiated cells of bone marrow, frozen under protection of cryoprotectants have quite 100% integrity. This index in reticular cells, promyelocytes and cells of lymphocyte series is slightly low. Wider cell spectrum of bone marrow after cryopreservation preserves under protection of DMSO under 7, 10% concentration and PEO-400. Low resistance to cryopreservation even under protection of used cryoprotectants is in the polychromatocytes and oxyphil normocytes. Cells of megakaryocyte series are not preserved at all. The segmented cells and macrophages are preserved only in the presence of 7, 10% DMSO. The incubation and freeze-thawing result in decreasing of glycogen amount in the cells of canine bone marrow. The highest glycogen amount was preserved after cryopreservation with 7, 10% DMSO and 10, 15% PEO-400.