

**Abstract.** In this article the influence of “Yodis-concentrate” on total protein and  $\gamma$ -globulins contents in blood serum of pigs with different types of higher nervous activity is discussing. For this research four animals groups of different types of higher nervous system were formed, which had been fed by hydrophilic solution of “Yodis Concentrate” 0.12 mg per kg, twice daily within 40 days. Blood was drawn from jugular vein before starting of experiment and every ten days through it. “Yodis-concentrate” less influenced animals with inert cortical processes by content of total protein. Probable decrease (by 16.1 %;  $p < 0.05$ ) of relative content of  $\gamma$ -globulins compare to initial index happened only in animals of weak type on 40th day after feeding of “Yodis-concentrate” was initiated, and absolute content of  $\gamma$ -globulins – only in pigs of unbalanced type on 30th day (by 20.1 %;  $p < 0.05$ ). In animals of others typological groups, changes of  $\gamma$ -globulins levels have a character of tendency. Further investigations will be implemented in terms of seeking of new regulators of immunity of pigs, which will give the opportunity to enhance the productivity of these animals.

**Keywords:** pigs, higher nervous activity, total protein,  $\gamma$ -globulins, “Yodis-concentrate”

УДК: 636.7.09:591.111.1:591.4:616-091

## **СТАН ЕРИТРОЦИТІВ ТА ПОКАЗНИК ГЕМАТОКРИТУ ЕРИТРОЦИТАРНОЇ МАСИ СОБАК ЗА РІЗНИХ ТЕРМІНІВ ЗБЕРІГАННЯ**

**І. М. ЯКИМЧУК**, аспірант\*

**А. О. МАКАРІН**, кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри терапії і клінічної діагностики

**О. М. ЯКИМЧУК**, кандидат біологічних наук, доцент кафедри терапії і клінічної діагностики

**М. О. МАРИНЮК**, кандидат ветеринарних наук, терапії і клінічної діагностики

**Національний університет біоресурсів та природокористування  
України**

*E-mail:* ivanyakym4uk@gmail.com

**Анотація.** На відміну від гуманної медицини, у ветеринарії не існує єдиного протоколу щодо тривалості зберігання еритроцитарної маси та показників її якості. Метою роботи було дослідження стану еритроцитів та показника гематокриту в еритроцитарній масі собак під час зберігання для визначення максимального терміну її трансфузійної здатності.

Для дослідження було використано 15 зразків еритроцитарної маси собак з терміном зберігання 1, 7, 14, 21, 28 та 35 діб. Точками контролю були морфологічні показники еритроцитів, а саме – зміна їх форми, а також

---

© А. О. МАКАРІН, О. М. ЯКИМЧУК, М. О. МАРИНЮК, 2018

\* Науковий керівник – кандидат ветеринарних наук, доцент А. О. Макарін

гематокритне число. За результатами досліджень найменш суттєві зміни гематокритного числа відбуваються в перші три тижні зберігання еритроцитарної маси. Після 21 доби зберігання еритроцитарної маси спостерігаються значні морфологічні зміни, що характеризуються появою ехіноцитів і сфероцитів, та зміни показника гематокриту, а саме – його збільшення з  $65 \pm 1,21$  % на 1 добу отримання еритроцитарної маси до  $75,8 \pm 1,00$  % на 35 добу її зберігання. Морфологічні зміни еритроцитів після 35-добового терміну зберігання еритроцитарної маси не дозволяють рекомендувати її для трансфузії реципієнтам.

У перспективі необхідним є проведення клінічних досліджень *in vivo* для визначення безпечності та ефективності трансфузії реципієнтам еритроцитарної маси з різними термінами її зберігання.

**Ключові слова:** собаки, еритроцитарна маса, гематокритне число, ехіноцити, сфероцити, вільний гемоглобін

**Актуальність.** На даний час переливання реципієнтам свіжої цільної крові у гуманній медицині практично не використовується, тоді як трансфузія еритроцитарної маси є загальноприйнятим протоколом лікування критично хворих людей за тяжких анемічних станів. Проте у ветеринарній медицині трансфузія тваринам-реципієнтам еритроцитарної маси майже не використовується. Так, сепарація крові тварин у ветеринарній медицині почала набувати поширення всього два десятиліття тому. Через це ціла галузь трансфузіології у ветеринарній медицині загалом та зокрема в медицині дрібних домашніх тварин значно відстає в розвитку порівняно з гуманною медициною.

Відносно нетривалий розвиток трансфузіології у ветеринарній медицині поєднаний з малою кількістю досліджень за даною темою. В той час як у гуманній медицині сьогодні цільну кров сепарують на еритроцитарну і тромбоцитарну масу, плазму, кріосупернатант та кріопреципітат, у ветеринарній медицині не існує навіть стандартів щодо терміну зберігання еритроцитарної маси.

**Аналіз останніх досліджень та публікацій.** Згідно зі стандартами FDA (Food and Drug Administration) основною ознакою придатності еритроцитарної маси для трансфузії людині є наявність 75 % введених еритроцитів реципієнту через 24 години після трансфузії еритроцитарної маси, в якій до кінця періоду зберігання гемолізується 1 % еритроцитів [Ошибка! Неизвестный аргумент ключа.]. У ветеринарній медицині максимальний термін зберігання еритроцитарної маси собак і котів вибраний емпірично і становить 35 і 30 діб відповідно (за умов застосування консерванту ЦФДА-1).

**Мета дослідження** – дослідити стан еритроцитів та показників гематокриту в еритроцитарній масі собак під час зберігання для визначення максимального терміну її трансфузійної придатності.

**Матеріали і методи дослідження.** Дослідження проводилися на кафедрі терапії і клінічної діагностики Національного університету біоресурсів і природокористування України та у відділенні банку крові тварин

ветеринарної клініки «Зоолукс» міста Києва. Для досліджу використовували еритроцитарну масу собак з різними термінами її зберігання.

Кров для отримання еритроцитарної маси відбирали від здорових собак-донорів віком від 2 до 7 років. Перед відбором крові проводили дослідження собак-донорів на бабезіоз та мікрофіляремію. Відбір крові проводили з яремної вени собаки без застосування седативних препаратів. Сепарацію цільної крові проводили шляхом центрифугування з подальшою плазмоекстракцією. Як консервант використовували розчин ЦФДА-1, до складу якого входить кислота лимонна (моногідрат), натрію цитрат, натрію дигідрофосфат, декстроза та аденін. Згідно з інструкцією виробника співвідношення об'ємів розчину консерванту до цільної крові становить 1:7. Після сепарації пакет з еритроцитарною масою маркували, зазначаючи ідентифікаційний номер донора, дату відбору та об'єм.

Згідно з рекомендаціями ветеринарної трансфузіології пакет з еритроцитарною масою поміщали у спеціальні холодильні камери у вертикальному підвішеному положенні за температури +1...+6 °С. Пакети кожного дня оглядали на предмет наявності гемолізу еритроцитів, зміни кольору еритроцитарної маси та появи згустків. Кожного дня пакети з еритроцитарною масою ретельно перемішували.

Усього для дослідження було використано п'ятнадцять пакетів з еритроцитарною масою, отриманою від різних собак-донорів.

Під час проведення досліджень визначали морфологію еритроцитів та показник гематокриту. Контроль показників здійснювали в день відбору крові (1 доба), а також на 7, 14, 21, 28 та 35 доби.

Для дослідження еритроцитів використовували мазок з еритроцитарної маси. Як барвник застосовували фарби Diff-Quick. Дослідження мазків проводили під об'єктивами масляної імерсії  $\times 100$ . Морфологічні зміни в еритроцитах позначали в «плюсах»: зміни морфологічних показників до 25 % еритроцитів – «+», 25–50 % еритроцитів – «++», 50–75 % еритроцитів – «+++», 75–100 % еритроцитів – «++++».

Для визначення гематокритного числа використовували центрифугування крові в гематокритних капілярах за 5000 об./хв протягом 10 хвилин. Після цього визначали відношення формених елементів крові до загального об'єму, виражене у відсотках.

**Результати досліджень та їх обговорення.** В усіх пробах еритроцитарної маси в першу добу досліджень не відзначали аглютинації чи морфологічних змін еритроцитів. Показник гематокриту становив  $65 \pm 1,21$  % (58–73 %) (табл. 1).

На 7 добу дослідження ознаки аглютинації не відзначені в усіх пробах еритроцитарної маси. Проте в 2 (13,3 %) пробах відзначали наявність ехіноцитів на «++». Показник гематокриту на 7 добу дослідження еритроцитарної маси собак становив  $66,5 \pm 1,21$  %, (59–75 %), (див. табл. 1).

На 14 добу в 5 (33,3 %) пробах еритроцитарної маси відзначали наявність ехіноцитів на «+» та «++». Аглютинація не відзначалася в усіх пробах. Показник гематокриту в пробах становив  $67,8 \pm 1,18$  %, (64–81 %).

На 21 добу аглютинація не відзначалася в усіх пробах. У 5 пробах еритроцитарної маси, в яких на 14 добу відзначали появу ехіноцитів, було виявлено сфероцити з показниками «+» та «++». Ще в 3 пробах еритроцитарної маси виявлено ехіноцити на «++». Показник гематокриту становив  $69,4 \pm 1,11$  %, (66–82 %), (див. табл. 1).

**1. Гематокритне число та морфологічні показники еритроцитарної маси собак за різних термінів зберігання,  $M \pm m$ ,  $n = 15$**

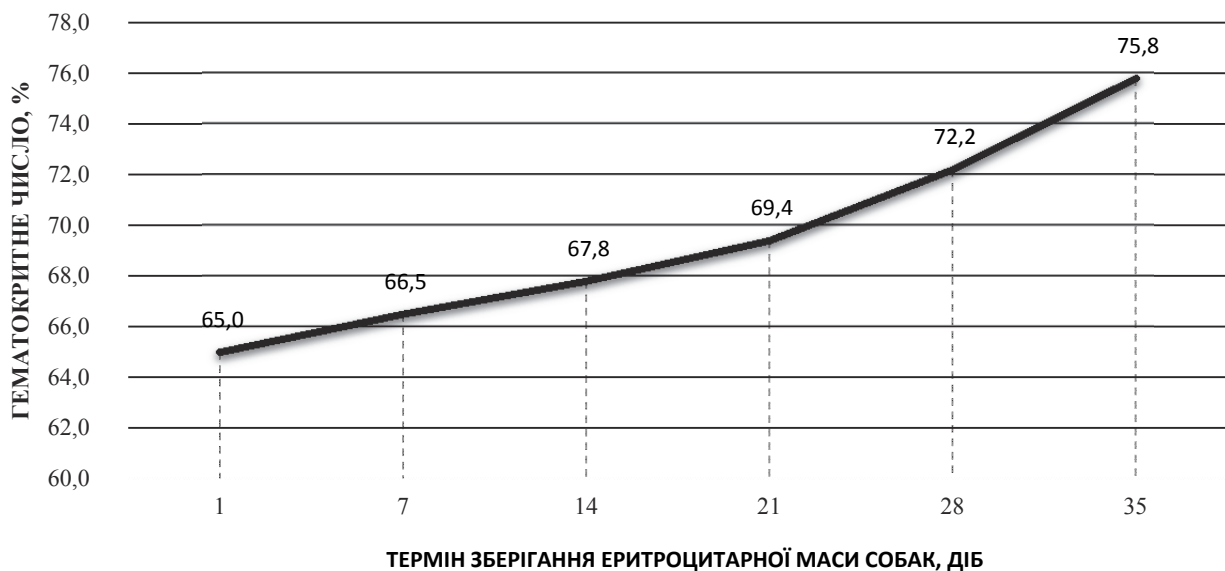
Термін зберігання, діб	Гематокритне число, %			Морфологічні зміни еритроцитів	
	Загальне	Різниця		Ехіноцити	Сфероцити
		порівняно з попереднім результатом	порівняно з 1-ю добою		
1	$65,0 \pm 1,21$	-	-	відсутні	відсутні
7	$66,5 \pm 1,21$	1,5	1,5	2/15	відсутні
14	$67,8 \pm 1,18^*$	1,3	2,8	5/15	відсутні
21	$69,4 \pm 1,11^{**}$	1,6	4,4	2/15	5/15
28	$72,2 \pm 1,07^{***}$	2,8	7,2	1/15	9/15
35	$75,8 \pm 1,00^{***}$	3,6	10,8	відсутні	15/15

*Примітка:* \* -  $p \leq 0,05$ ; \*\* -  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* -  $p \leq 0,001$  порівняно з 1 добою зберігання еритроцитарної маси

На 28 добу зберігання еритроцитарної маси аглютинація не відзначалась. У 9 пробах крові встановлено наявність сфероцитів з показниками «++», ще водній пробі – ехіноцитів «++». Показник гематокриту становив  $72,2 \pm 1,07$  % (68–82 %).

На 35 добу в одній пробі еритроцитарної маси було виявлено аглютинацію. У всіх пробах крові присутні сфероцити з показниками від «++» до «++++». Показник гематокриту становив  $75,8 \pm 1,00$  % (72–86 %).

Таким чином, отримані нами результати показують, що протягом усього періоду досліджень відзначається збільшення показника гематокриту, що дозволяє прослідкувати динаміку його змін в еритроцитарній масі собак впродовж її зберігання (рис. 1). Так, підвищення показника гематокриту в період з 1 до 7 добиз берігання еритроцитарної маси в середньому становить 1,5 %, з 7 14 доби – 1,3 %, з 14 до 21 доби – 1,6 %, з 21 до 28 доби – 2,8 %, з 28 до 35 доби – 3,6 %. Загалом за 35 діб зберігання еритроцитарної маси собак показник гематокриту зріс на 10,8 % (див. табл. 1, рис. 1).



**Рис. 1. Динаміка змін гематокритного числа еритроцитарної маси собак під час зберігання,  $M \pm m$ ,  $n = 15$**

Морфологічні зміни еритроцитів впродовж часу зберігання еритроцитарної маси можуть мати значні наслідки для реципієнта за подальшої її трансфузії. Так, за даними Н. Relevy et al. введення реципієнту еритроцитарної маси пізніх строків зберігання може мати негативний вплив на перфузію та оксигенацію периферичних тканин, що збільшує вірогідність появи поліорганної патології.

Основним показником біомеханічних змін еритроцитів є їх морфологічна структура. В нормі еритроцити мають вигляд двоввігнутого диска, що дозволяє їм краще змінювати свою форму. Крім того, розмір еритроцита собаки становить в середньому 8 мкм, у той час як діаметр найменшого капіляра – всього 3 мкм. Виходячи з цього, здатність до деформації еритроцита з формою двоввігнутого диска є критично важливою для забезпечення адекватної перфузії периферичних тканин [3]. Під час довготривалого зберігання еритроцитарної маси в еритроцитах відбувається зміна форми на ехіноцити внаслідок протрузії мембрани клітини. Під час трансфузії еритроцитів, що знаходяться на ранній стадії перетворення на ехіноцит, ці зміни є зворотними. Проте в процесі подальшого зберігання еритроцитарної маси еритроцити втрачають частину мембрани, утворюючи мікрочастинки, що містять гемоглобін, та починають перетворюватися з ехіноцитів на сфероцити, які повністю втрачають здатність до деформації [2].

Мікрочастинки, що містять гемоглобін, можуть також погіршувати перфузію периферичних тканин. Для проходження еритроцитів через вузькі капіляри, крім деформації самих клітин, важливу роль відіграє виділення Нітрогену оксиду ендотелієм судин, що призводить до місцевої

вазодилатації та проходження еритроцитів. Проте вільний гемоглобін, а також мікрочастинки, що містять гемоглобін, здатні швидше реагувати з Нітрогену оксидом за рахунок меншого розміру та дефекту мембранної структури. Donadee C. et al досліджували у людини можливість вільного гемоглобіну та мікрочастинок, що містять гемоглобін, поглинати NO, в результаті чого виявили, що вони в 1000 разів швидше реагують з NO, ніж цілісні еритроцити.

In vivo на моделі пацюків було встановлено, що вільний гемоглобін, навіть у концентрації менше 10 мкмоль/л, здатний викликати виражену вазоконстрикцію судин. Більше того, зниження біодоступності NO може підвищувати вірогідність виникнення внутрішньосудинних тромбозів, адгезії лейкоцитів та діapedезу, а також посилення проникності ендотелію [5].

В результаті проведених досліджень ми відзначили чітку кореляцію тривалості зберігання еритроцитарної маси зі зміною морфології еритроцитів та їх руйнуванням. Протягом перших двох тижнів зберігання появу ехіноцитів було зареєстровано лише в п'яти із п'ятнадцяти проб еритроцитарної маси собак. На 28 добу зберігання еритроцитарної маси в 9 пробах нами встановлено появу сфероцитів вже у 25–50 % еритроцитів. За даними літератури в гуманній медицині це може свідчити про значне зниження ефективності переливання еритроцитарної маси реципієнтам, а можливо – і появу ускладнень у вигляді тромбозів та активації прозапальної відповіді через активацію лейкоцитів.

На 35 добу зберігання еритроцитарної маси собак сфероцити були виявлені у всіх пробах. Причому зміна форми еритроцитів спостерігалася практично в 100 % еритроцитів. Враховуючи ще й значне збільшення гематокритного числа, можна зробити висновок, що еритроцитарна маса собак 35-добового терміну зберігання не може бути рекомендована для трансфузії пацієнтам.

Утворення мікрочасток з гемоглобіном та виділення вільного гемоглобіну відбувається під час руйнування плазматичної мембрани еритроцита. Цей процес супроводжується набряком еритроцитів, що відображається збільшенням гематокритного числа в динаміці [6]. Так, під час проведення досліджень нами було встановлено, що з 1 до 21 доби зберігання еритроцитарної маси собак, гематокритне число збільшується щотижня на 1,3–1,6 %. Проте в період з 21 до 28 доби зберігання еритроцитарної маси собак гематокритне число збільшилося вже на 2,8 %, а в період з 28 до 35 доби – на 3,6 %. Таке швидке підвищення гематокритного числа корелює зі збільшенням кількості сфероцитів у еритроцитарній масі. Набряклі еритроцити не можуть виконувати свої функції. Через це, теоретично, еритроцитарна маса з терміном зберігання більше 21 доби має значно меншу ефективність підчас трансфузії реципієнту.

**Висновки та перспективи.** Зберігання еритроцитарної маси собак терміном більше 3 тижнів призводить до зміни морфології еритроцитів та підвищення гематокритного числа. Починаючи з 21 доби зберігання еритроцитарної маси собак значно змінюється морфологія еритроцитів з трансформацією їх у сфероцити та швидко зростає гематокритне число,

що відображає набряк клітин крові. Еритроцитарна маса собак 35-добового терміну зберігання містить велику кількість патологічних форм еритроцитів, що може викликати порушення периферичної перфузії у реципієнтів за рахунок зниження біомеханічних властивостей та порушеної здатності до переносу Оксигену.

В подальшому необхідним є проведення лабораторних досліджень щодо змін морфології еритроцитів за умов додавання спеціальних поживних середовищ для їх зберігання, а також проведення клінічних досліджень *in vivo* з визначення безпечності та ефективності трансфузії реципієнтам еритроцитарної маси різного терміну зберігання.

#### **Список використаних джерел**

1. Relevy, H. Bloodbanking-induced alteration of red blood cell flow properties / H. Relevy, A. Koshkaryev, N. Mannyetal.// *Transfusion.* –2008. – Vol.48(1). – P. 136–146.
2. Berezina, T. L. Influence of storage on red blood cell rheological properties / T. L. Berezina, S. B. Zaets, C. Morgan et al. // *J. Surg. Res.* – 2002. – Vol. 102(1). – P. 6–12.
3. Wagner, G. M. Spectrin oxidation correlateswith membrane vesiculation in stored RBCs / G. M. Wagner, D. T. Chiu, J. H. Qju et al. // *Blood.* – 1987. – Vol.69 (6). – P. 1777–1778.
4. Donadee, C. Nitric oxide scavenging by red blood cell microparticles and cell-free hemoglobin as a mechanism for the red cell storage lesion / C. Donadee, N. J. Raat, T. Kaniyas et al. // *Circulation.* – 2011. – Vol. 124(4). – P. 465–476.
5. Tousoulis, D. The role of nitricoxide on endothelial function / D. Tousoulis, A. M. Kampoli, C. Tentolouris et al. // *Curr. Vasc. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 10(1). – P. 4–18.
6. Watering, L. Red cell storage and prognosis / L. Watering // *Vox Sang.* – 2011. – Vol. 100(1). – P. 36–45.
7. Klein, H. G. Transfusion of red cells / H. G. Klein, D. J. Anstee, P. L. Mollison. – *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine (11th Edition)*, 2005. – P. 362–373.

#### **References**

1. Relevy, H., Koshkaryev, A., Manny, N. Et al. (2008). Bloodbanking-induced alteration of red blood cell flow properties. *Transfusion*, 48(1), 136–146.
2. Berezina, T. L., Zaets, S. B., Morgan, C. et al. (2002). Influence of storage on red blood cell rheological properties. *J Surg Res*, 102 (1), 6–12.
3. Wagner, G. M., Chiu, D. T., Qju, J.H. et al. (1987). Spectrin oxidation correlateswith membrane vesiculation in stored RBCs. *Blood*, 69 (6), 1777–1778.
4. Donadee, C., Raat, N. J., Kaniyas, T. et al. (2011). Nitric oxide scavenging by red blood cell microparticles and cell-free hemoglobin as a mechanism for the red cell storage lesion. *Circulation*, 124 (4), 465–476.
5. Tousoulis, D., Kampoli, A. M., Tentolouris, C. et al. (2012). The role of nitricoxide on endothelial function. *Curr Vasc Pharmacol*, 10 (1), 4–18.
6. Watering, L. (2011). Red cell storage and prognosis. *Vox Sang*, 100 (1), 36–45.
7. Klein, H. G., Anstee, D. J., Mollison, P. L. (2005). Transfusion of red cells. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine (11th Edition)*, 362–373.

## СОСТОЯНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ И ПОКАЗАТЕЛЬ ГЕМАТОКРИТА ЭРИТРОЦИТАРНОЙ МАССЫ СОБАК ПРИ РАЗНЫХ СРОКАХ ХРАНЕНИЯ

И. Н. Якимчук, А. О. Макарин, О. Н. Якимчук, Н. А. Марынюк

**Аннотация.** В отличие от гуманной медицины, в ветеринарии не существует единого протокола по продолжительности хранения эритроцитарной массы и показателям ее качества.

Целью работы было исследование состояния эритроцитов и показателя гематокрита в эритроцитарной массе собак во время хранения для определения максимального срока ее трансфузионной способности. Для исследования были использованы 15 образцов эритроцитарной массы собак со сроком хранения 1, 7, 14, 21, 28 и 35 суток. Точками контроля были морфологические показатели эритроцитов, а именно – изменение их формы, а также гематокритное число. По результатам исследований наименее существенные изменения гематокритного числа происходят в первые три недели хранения эритроцитарной массы. После 21 дня хранения эритроцитарной массы наблюдаются значительные морфологические изменения, характеризующиеся появлением эхиноцитов и сфероцитов, и изменения показателя гематокрита, а именно – его увеличение с  $65 \pm 1,21 \%$  в 1 сутки получения эритроцитарной массы до  $75,8 \pm 1,00 \%$  – на 35 сутки ее хранения. Морфологические изменения эритроцитов после 35-суточного срока хранения эритроцитарной массы не позволяют рекомендовать ее для трансфузии реципиентам.

В перспективе необходимо проведение клинических исследований *in vivo* для определения безопасности и эффективности трансфузии реципиентам эритроцитарной массы с различными сроками ее хранения.

**Ключевые слова:** собаки, эритроцитарная масса, гематокритное число, эхиноциты, сфероциты, свободный гемоглобин

## CONDITION OF EYRTROCYTES AND HEMATOCRIT INDEX OF CANINE PRBCAT DIFFERENT STORAGE TERMS

I. M. Yakymchuk, A. O. Makarin, O. M. Yakymchuk, M. O. Marynyuk

**Abstract.** Unlike humane medicine, veterinary medicine does not have a unitary protocol on the duration of storage of packed red blood cells (pRBC) and its quality indicators. The aim of the work was to study the state of erythrocytes and the index of hematocrit in the canine pRBC during storage to determine the maximum period of its transfusion ability. For the study, 15 samples of the canine pRBC with the storage period of 1, 7, 14, 21, 28 and 35 days were used. The control points were the morphological parameters of