

Bài báo nghiên cứu

**KHẢO SÁT HIỆU QUẢ BẢO QUẢN TẾ BÀO HỒNG CẦU THỎ
(*Oryctolagus cuniculus*) TRONG GLYCERIN 37%****Ở NHIỆT ĐỘ 4°C VÀ -18°C IN VITRO****Nguyễn Thị Hồng Nhung, Phan Thị Phương Thanh***

Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

*Tác giả liên hệ: Phan Thị Phương Thanh – Email: phanthanhyd@gmail.com

Ngày nhận bài: 10-9-2024; ngày nhận bài sửa: 08-11-2024; ngày duyệt đăng: 18-01-2025

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm khảo sát hiệu quả bảo quản tế bào hồng cầu thỏ (*Oryctolagus cuniculus*) trong glycerin 37% ở nhiệt độ 4°C và -18°C. Chúng tôi đã phân tích những thay đổi về hình thái và thể tích tế bào đóng gói (PCV) theo thời gian. Kết quả cho thấy tế bào hồng cầu lưu trữ ở -18°C duy trì sự ổn định hình thái tốt hơn, với hơn 90% tế bào bình thường trong hai tuần đầu tiên. Ngược lại, hồng cầu lưu trữ ở nhiệt độ 4°C thể hiện những thay đổi đáng kể hơn. Những phát hiện này nhấn mạnh tầm quan trọng của nồng độ glycerin và nhiệt độ trong bảo quản tế bào hồng cầu thỏ, cung cấp thông tin cho các ứng dụng nghiên cứu.

Từ khóa: glycerin 37%; PCV hồng cầu; tế bào hồng cầu thỏ; hình thái hồng cầu

1. Giới thiệu

Tế bào hồng cầu có vai trò phân phối oxy đến các tế bào trong cơ thể, đồng thời có khả năng biến dạng cao để duy trì khả năng tuần hoàn hiệu quả. Tuy nhiên, trong quá trình lưu trữ, tế bào hồng cầu có thể gặp các “tổn thương lưu trữ” làm giảm khả năng biến dạng và hiệu quả hoạt động của tế bào. Nguyên nhân của “tổn thương lưu trữ” chủ yếu là do mất tính toàn vẹn của màng tế bào, sự thay đổi về hình thái, diện tích bề mặt và thể tích tế bào, hoặc do sự lão hóa của tế bào. Các “tổn thương lưu trữ” này dẫn đến sự biến đổi hình thái tế bào hồng cầu từ dạng hình đĩa lõm hai mặt thành các dạng bất thường (da gai, cầu-da gai, ...), làm cho tế bào trở nên nhỏ và đặc hơn (Geekiyanage et al., 2020; Barshtein et al., 2021).

Việc lưu trữ hồng cầu là một nhu cầu thiết thực, phục vụ cho mục đích truyền máu, nghiên cứu khoa học hay hoạt động học tập của học sinh, sinh viên. Gần đây, một số nghiên cứu chỉ ra rằng bảo quản máu người trong glycerol (glycerin) 40% ở nhiệt độ -80°C có hiệu quả bảo quản tốt và có thể được lưu trữ trong 10 năm hoặc lâu hơn (Rogers et al., 2018; Truong et al., 2015). Glycerol được xem là chất không gây độc cho tế bào, có khả năng thẩm

Cite this article as: Nguyen Thi Hong Nhung, & Phan Thi Phuong Thanh (2025). Evaluation of the effectiveness of preserving rabbit red blood cells in 37% glycerin at 4° C and -18° C in vitro. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 22(2), 260-270.

qua màng tế bào hồng cầu. Tuy nhiên, sự gia tăng nồng độ glycerol trong huyết tương cơ thể làm thay đổi cân bằng nội môi của tế bào hồng cầu, dẫn đến stress thẩm thấu và có thể gây tan huyết (Pasciu et al., 2021). Nghiên cứu của Pasciu và cộng sự (Pasciu et al., 2021) cho thấy rằng khi hàm lượng glycerol trong tế bào hồng cầu cừu tăng vượt quá 200 mg/dL sẽ gây tình trạng tan huyết.

Glycerol là dung dịch có khả năng bảo quản tế bào hồng cầu hiệu quả. Tuy nhiên, nếu nồng độ không phù hợp, nó có thể gây ra tình trạng tan huyết. Hiện nay, máu thỏ được sử dụng phổ biến cho mục đích nghiên cứu hoặc phục vụ cho hoạt động học tập của học sinh, sinh viên ở cấp bậc phổ thông và đại học. Nhiều phòng thí nghiệm được trang bị thiết bị đơn giản, điều này đặt ra thách thức trong việc lưu trữ và bảo quản mẫu.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành khảo sát bảo quản hồng cầu thỏ trong glycerin 37% ở hai điều kiện nhiệt độ là 4°C và -18°C, thông qua việc khảo sát tỉ lệ hồng cầu thỏ bất thường và thể tích tế bào đóng gói (PCV) theo thời gian. Nghiên cứu của chúng tôi nhằm phát triển một quy trình bảo quản đơn giản cho mẫu máu thỏ trong điều kiện phòng thí nghiệm mà không cần sử dụng hóa chất hay thiết bị phức tạp và đắt tiền.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng máu thỏ được thu nhận từ giống thỏ nhà (*Oryctolagus cuniculus*) khoảng 15-24 tháng tuổi, nặng khoảng 4 kg. Thỏ được nuôi trong chuồng gỗ (80 cm x 70 cm x 65 cm) ở môi trường nhiệt độ phòng tại Phòng Thí nghiệm Bộ môn Sinh học, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.

Hóa chất

Glycerol (Xilong scientific Co.), NaCl (Merck), EDTA (Hồng Thiện Mỹ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế thí nghiệm

Thí nghiệm gồm 6 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại 5 lần:

(1) Hồng cầu thỏ trong glycerin 37% ở -18°C

(2) Hồng cầu thỏ trong glycerin 37% ở 4°C

(3) Hồng cầu thỏ trong NaCl 0,6% ở -18°C (đối chứng dương)

(4) Hồng cầu thỏ trong NaCl 0,6% ở 4°C (đối chứng dương)

(5) Hồng cầu thỏ trong ống nghiệm EDTA, không bổ sung thêm dung dịch nào khác, bảo quản ở -18°C (đối chứng âm)

(6) Hồng cầu thỏ trong ống nghiệm EDTA, không bổ sung thêm dung dịch nào khác, bảo quản ở 4°C (đối chứng âm).

2.2.2. Phương pháp thu nhận máu thỏ và chuẩn bị nghiệm thức

Máu thỏ sử dụng cho các thí nghiệm được lấy từ tĩnh mạch tai thỏ (Moore et al., 2015), ngay lập tức được cho vào ống nghiệm có chất chống đông EDTA (Ethylene Diamine

Tetraacetic Acid) (Washington & Hoosier, 2012). Lượng máu thử thu nhận là 1 mL/lần/con/ngày. Tiêu chuẩn mẫu máu được sử dụng làm thí nghiệm là số lượng tế bào hồng cầu phải đạt 5,46-7,94 ($\times 10^6/\mu\text{L}$) (Moore et al., 2015) và không bị vón cục.

Mỗi nghiệm thức bao gồm: 100 μL máu thử và dung dịch bảo quản, hỗn hợp được lưu trữ trong ống nghiệm có nắp đậy kín. Tất cả các mẫu được bảo quản trong tủ lạnh Sharp SJ-16V-SL. Chúng tôi khảo sát ở hai mức nhiệt độ là 4°C tương đương nhiệt độ ở ngăn mát tủ lạnh, và ở -18°C tương đương nhiệt độ ở ngăn đông tủ lạnh. Số liệu được thu thập hàng ngày, cách nhau 24 giờ, mỗi ống mẫu sau khi lấy ra khỏi điều kiện bảo quản lạnh để thu thập số liệu thì không tái sử dụng. Đối với ống nghiệm ở -18°C, chúng tôi để đông tự nhiên ở điều kiện 4°C.

2.2.3. Phương pháp xác định PCV (Packed Cell Volume) hồng cầu thử theo thời gian

Mỗi nhóm thí nghiệm được xác định giá trị PCV (Packed Cell Volume) hồng cầu bằng phương pháp microhematocrit. Theo đó, mẫu trong mỗi nhóm thí nghiệm được hút vào ống mao quản (có tráng EDTA), một đầu của ống mao quản được bịt bằng đất sét, sau đó li tâm ở vận tốc 10.000 vòng/phút trong 5 phút bằng máy li tâm Hermle Z 216 M. Sau khi li tâm, lớp màu đỏ ở phía đầu bịt đất sét của ống mao quản là lớp hồng cầu, giá trị PCV được xác định dựa vào tỉ lệ phần trăm của chiều cao lớp hồng cầu và chiều cao của máu toàn phần (Washington & Hoosier, 2012).

2.2.4. Phương pháp xác định tỉ lệ hồng cầu thử bất thường theo thời gian

Tế bào hồng cầu thử bất thường được xác định bằng cách đếm hồng cầu bằng buồng đếm Neubauer tráng bạc, dưới kính hiển vi quang học Olympus cx21. Tiêu chí xác định hồng cầu bình thường và bất thường dựa trên các tiêu chuẩn về hình thái hồng cầu (Geekyanage et al., 2020)

Mẫu đếm được pha loãng sao cho có 5-10 tế bào/ô nhỏ, dung dịch dùng để pha loãng tương ứng với dung dịch dùng để bảo quản hồng cầu. Số lượng tế bào trong 1 mm^3 được xác định theo công thức: $N = A \times 4000 \times \text{Độ pha loãng} / 5 \times 16$ (N là số tế bào hồng cầu trong 1 mm^3 máu, A là tổng số tế bào đếm trong 80 ô nhỏ). Từ đó, tính toán để xác định tỉ lệ tế bào hồng cầu bất thường.

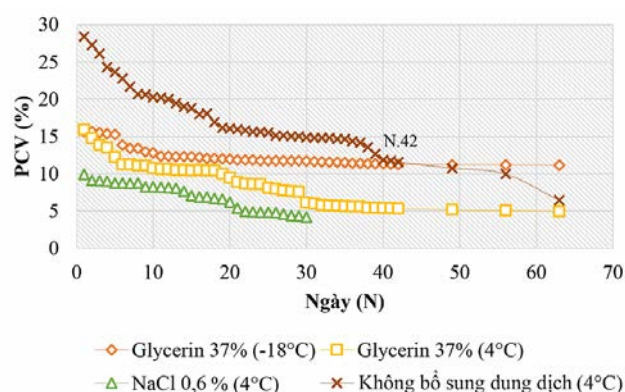
2.2.5. Phương pháp xử lý thống kê

Các số liệu của đề tài được xử lý bằng phần mềm Excel ở độ tin cậy 95%, kiểm định Wilcoxon và kiểm định Mann Whitney.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả khảo sát PCV hồng cầu thử theo thời gian

Trong thiết kế thí nghiệm, chúng tôi bố trí 6 nghiệm thức khác nhau, tuy nhiên, ở hai nghiệm thức là hồng cầu thử trong NaCl 0,6% ở -18°C và không bổ sung dung dịch ở -18°C, tế bào hồng cầu bị tan bào và không xác định được giá trị PCV sau ngày đầu tiên lưu trữ. Vì vậy, chúng tôi không ghi nhận được kết quả đối với hai nghiệm thức thử nghiệm này.



Hình 1. PCV hồng cầu ở các nghiệm thức thử nghiệm theo thời gian

Kết quả PCV hồng cầu thử cho thấy có giá trị giảm dần theo thời gian khảo sát ở các nghiệm thức thử nghiệm (Hình 1). Trong đó, giá trị PCV hồng cầu trong mẫu không bổ sung dung dịch (ở 4°C) cho thấy sự suy giảm nghiêm trọng, bắt đầu từ 28,4% vào ngày đầu khảo sát, giảm xuống 21,7% vào ngày 7, tiếp tục giảm xuống 14,9% vào ngày thứ 30, và còn 6,4% vào ngày 63. Giá trị PCV hồng cầu thử trong mẫu máu sau khi thu từ thỏ chúng tôi ghi nhận là 28,4%, thấp hơn so với công bố trước đây của Alessandro cộng sự (Alessandro et al., 2010) với giá trị PCV khoảng 30-40% ở thỏ nuôi (Melillo & DVM, 2007), nhưng phù hợp với công bố của Musongong và cộng sự (Musongong et al., 2003) là PCV hồng cầu thử trưởng thành ở trong khoảng 22-38%. Sự khác biệt về giá trị PCV ở các nghiệm cứu có thể do sự khác biệt ở chủng thỏ, điều kiện nuôi dưỡng...

Giá trị PCV hồng cầu thử trong NaCl 0,6% ở 4°C và glycerin 37% ở 4°C giảm theo thời gian, có giá trị thấp <5% lần lượt là 4,2% ở ngày 30 và 4,9% ở ngày 63. Trong khi đó, giá trị PCV hồng cầu thử trong glycerin 37% ở -18°C có tốc độ giảm chậm nhất, bắt đầu là 15,7% ở ngày đầu, 13,4% ở ngày 7, 11,7% ở ngày 30 và 11,2% ở ngày 63.

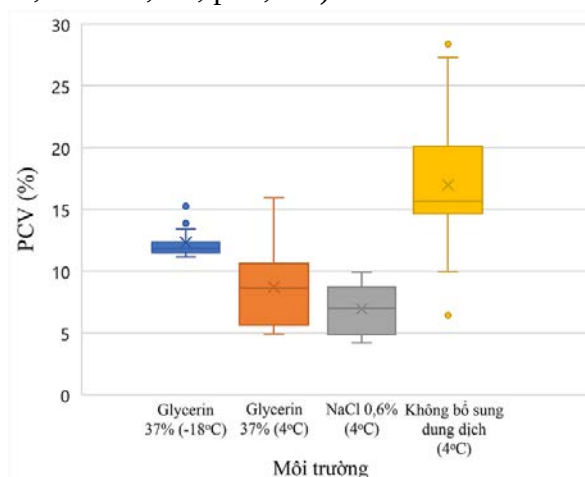
Chúng tôi tiến hành phân tích thống kê về mối quan hệ giá trị PCV ở các nghiệm thức và kết quả được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. So sánh giá trị PCV hồng cầu thử ở các nghiệm thức

Môi trường	PCV (%)		p1*	p2*	p3*
	Trung vị	Khoảng tứ phân vị			
Glycerin 37% (-18°C)	11,8	11,5; 12,3			
Glycerin 37% (4°C)	8,6	5,7; 10,6	<0,001		
NaCl 0,6% (4°C)	6,9	4,9; 8,7	<0,001	<0,001	
Không bổ sung dung dịch (4°C)	15,6	14,7; 20,0	<0,001	<0,001	<0,001

* Kiểm định Wilcoxon; p1 so sánh giá trị PCV hồng cầu thử trong glycerin 37% (-18°C) với giá trị PCV hồng cầu thử trong các nghiệm thức: glycerin 37% (4°C), NaCl 0,6% (4°C) và không bổ sung dung dịch (4°C); p2 so sánh giá trị PCV hồng cầu thử trong glycerin 37% (4°C) với giá trị PCV hồng cầu thử trong các nghiệm thức: NaCl 0,6% (4°C) và không bổ sung dung dịch (4°C); p3 so sánh giá trị PCV hồng cầu thử trong NaCl 0,6% (4°C) với giá trị PCV hồng cầu thử trong nghiệm thức không bổ sung dung dịch (4°C).

Kết quả phân tích thống kê (Bảng 1) cho thấy có sự khác biệt đáng kể về giá trị trung vị PCV tế bào hồng cầu thỏ trong các môi trường khác nhau, với $p < 0,001$. Trong đó, nhóm hồng cầu thỏ được bảo quản trong môi trường NaCl 0,6% ở nhiệt độ 4°C có PCV thấp hơn một cách đáng kể so với các nhóm còn lại. Ngược lại, ở nhóm hồng cầu thỏ không được bổ sung dung dịch ở nhiệt độ 4°C có giá trị PCV cao nhất, đạt 15,6%, so với các môi trường còn lại có giá trị PCV dao động từ 6,9% đến 11,8% ($p < 0,001$). Ngoài ra, khi so sánh giữa giá trị PCV của hồng cầu thỏ trong cùng môi trường bảo quản là glycerin 37%, mẫu được lưu trữ ở nhiệt độ -18°C có giá trị trung vị PCV cao hơn so với mẫu được bảo quản ở nhiệt độ 4°C (tương ứng là 11,8% và 8,6%; $p < 0,001$).



Hình 2. Phân bố giá trị PCV hồng cầu thỏ ở các nghiệm thức

Khi xem xét sự thay đổi giá trị PCV trong suốt thời gian khảo sát, các mẫu hồng cầu được bảo quản trong glycerin 37% (ở -18°C) cho thấy ít biến động hơn so với các nhóm mẫu còn lại (Hình 2). Như vậy, giá trị PCV ở tất cả các mẫu có xu hướng giảm dần theo thời gian trong tổng 63 ngày khảo sát. Để làm rõ sự khác biệt về giá trị PCV ở các mốc thời gian khác nhau, chúng tôi đã phân chia kết quả thành hai nhóm thời gian: từ ngày 1 đến 14 và từ ngày 15 trở đi, dựa trên các công trình nghiên cứu trước đây (Rous & Turner, 1916; Tuo et al., 2014) cùng với các khuyến nghị về sử dụng các sản phẩm hồng cầu thỏ thương mại.

Bảng 2. So sánh PCV hồng cầu thỏ theo hai nhóm ngày (ngày 1-14, ngày 15 trở đi)

Môi trường	PCV (%)		p1*
	Trung vị (khoảng tứ phân vị)		
	Ngày 1-14	Ngày 15 trở đi	
Glycerin 37% (-18°C)	13,4 (12,4; 15,4)	11,7 (11,4; 11,8)	<0,001
Glycerin 37% (4°C)	11,2 (10,6; 13,5)	6,1 (5,4; 8,6)	<0,001
NaCl 0,6% (4°C)	8,7 (8,2; 9,0)	4,9 (4,7; 6,6)	<0,001
Không bổ sung dung dịch (4°C)	21,2 (20,2; 24,3)	14,9 (13,6; 15,8)	<0,001
p2**	<0,001	<0,001	
p3**	<0,001	<0,001	
p4**	<0,001	<0,001	
p5**	<0,001	<0,001	
p6**	<0,001	<0,001	
p7**	<0,001	<0,001	

*Kiểm định Mann Whitney, ** Kiểm định Wilcoxon; p1 so sánh giá trị PCV hồng cầu thỏ trong các nghiệm thức theo hai nhóm ngày; p2 so sánh giá trị PCV hồng cầu thỏ trong glycerin 37% (-18°C) và glycerin 37% (4°C) ở từng nhóm thời gian; p3 so sánh giá trị PCV hồng cầu thỏ trong glycerin 37% (-18°C) và NaCl 0,6% (4°C) ở từng nhóm thời gian; p4 so sánh giá trị PCV hồng cầu thỏ trong glycerin 37% (-18°C) và nghiệm thức không bổ sung dung dịch (4°C) ở từng nhóm thời gian; p5 so sánh giá trị PCV hồng cầu thỏ trong glycerin 37% (4°C) và NaCl (4°C) ở từng nhóm thời gian; p6 so sánh giá trị PCV hồng cầu thỏ trong glycerin 37% (4°C) và nghiệm thức không bổ sung dung dịch (4°C) ở từng nhóm thời gian; p7 so sánh giá trị PCV hồng cầu thỏ trong NaCl 0,6% (4°C) và nghiệm thức không bổ sung dung dịch (4°C) ở từng nhóm thời gian.

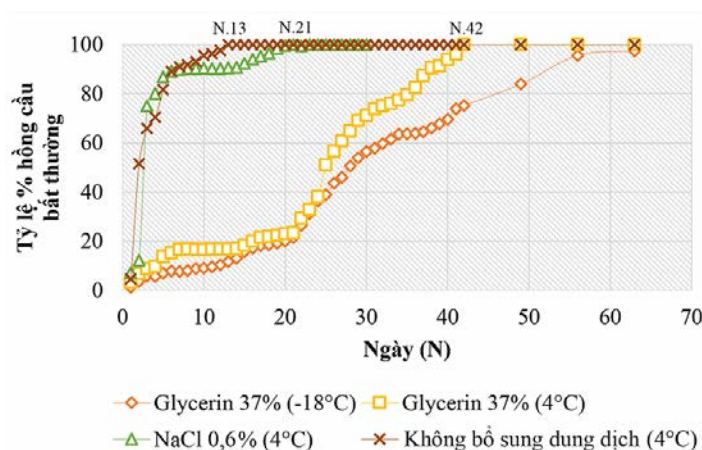
Khi phân tích dữ liệu giá trị PCV dựa theo hai nhóm ngày là từ ngày 1-14, và từ ngày 15 trở đi (Bảng 2) cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, với $p < 0,001$. Trong đó, giá trị PCV trong nhóm ngày 1-14 cao hơn giá trị PCV từ ngày 15 trở đi ở tất cả các nghiệm thức. Tuy nhiên, giá trị PCV hồng cầu trong glycerin 37% ở nhiệt độ -18°C không có sự giảm rõ rệt như các nghiệm thức còn lại ($p < 0,001$).

Trong quá trình bảo quản, có nhiều sự thay đổi trong tế bào hồng cầu dẫn đến biến đổi về hình thái tế bào. Thể tích tế bào giảm dần theo thời gian, đặc biệt là các tế bào hồng cầu già (Barshteinet al., 2021; Geekiyanage et al., 2020), cho thấy sự phù hợp khi giá trị PCV của các nhóm mẫu giảm dần theo thời gian. Đặc biệt, các sự thay đổi này thể hiện rõ rệt ở ngày bảo quản thứ 15 trở đi. Kết quả này tương ứng với công bố của Tuo và cộng sự (Tuo et al., 2014) là tế bào hồng cầu khỏe mạnh chỉ quan sát được trong 14 ngày đầu lưu trữ, từ ngày 15 trở đi thì quan sát được ít tế bào nguyên vẹn hơn và không thấy sự hiện diện của tế bào khỏe mạnh. Một số sản phẩm hồng cầu thỏ thương mại hiện nay thường được khuyến nghị sử dụng sản phẩm trong vòng hai tuần như: sản phẩm hồng cầu thỏ của Công ty Rockland Immunochemical (Hoa Kỳ) được bảo quản trong dung dịch đệm PBS (0,02 M potassium phosphate, 0,15 M sodium chloride, pH 7,2 ở 4°C), sản phẩm hồng cầu thỏ của Công ty Pel-Freez Biologicals (Hoa Kỳ) được bảo quản trong đệm citrate saline ở 2-8°C.

Tuy nhiên, giá trị PCV hồng cầu thỏ bảo quản trong glycerin 37% (ở -18°C) có tốc độ giảm chậm và ổn định hơn so với các nghiệm thức còn lại, cho thấy hiệu quả bảo quản tốt và được kỳ vọng là điều kiện bảo quản được áp dụng trong thực tế.

3.2. Kết quả khảo sát tỉ lệ hồng cầu bất thường theo thời gian

Kết quả khảo sát tỉ lệ hồng cầu bất thường cho thấy có sự tăng dần theo thời gian ở tất cả các nghiệm thức (Hình 3). Trong đó, tỉ lệ hồng cầu bất thường đạt 100% ở các nghiệm thức glycerin 37% (ở 4°C), NaCl 0,6% (ở 4°C) và không bổ sung dung dịch (ở 4°C) lần lượt vào các ngày thứ 42, 21 và 13 của quá trình lưu trữ. Đối với hồng cầu trong glycerin 37% (ở -18°C), tỉ lệ hồng cầu bất thường tăng chậm hơn so với các nghiệm thức còn lại, và có giá trị là 97,5% vào ngày 63.



Hình 3. Tỷ lệ hồng cầu bất thường trong các nghiệm thức theo thời gian bảo quản

Bảng 3. So sánh tỷ lệ hồng cầu thô bất thường trong các nghiệm thức

Môi trường	Tỷ lệ bất thường (%)		p1*	p2*	p3*
	Trung vị	Khoảng tứ phân vị			
Glycerin 37% (-18°C)	31,3	10,4; 63,5			
Glycerin 37% (4°C)	32,8	16,9; 77,3	<0,001		
NaCl 0,6% (4°C)	93,3	90,2; 100	<0,001	<0,001	
Không bổ sung dung dịch (4°C)	100,0	97,6; 100	<0,001	<0,001	0,023

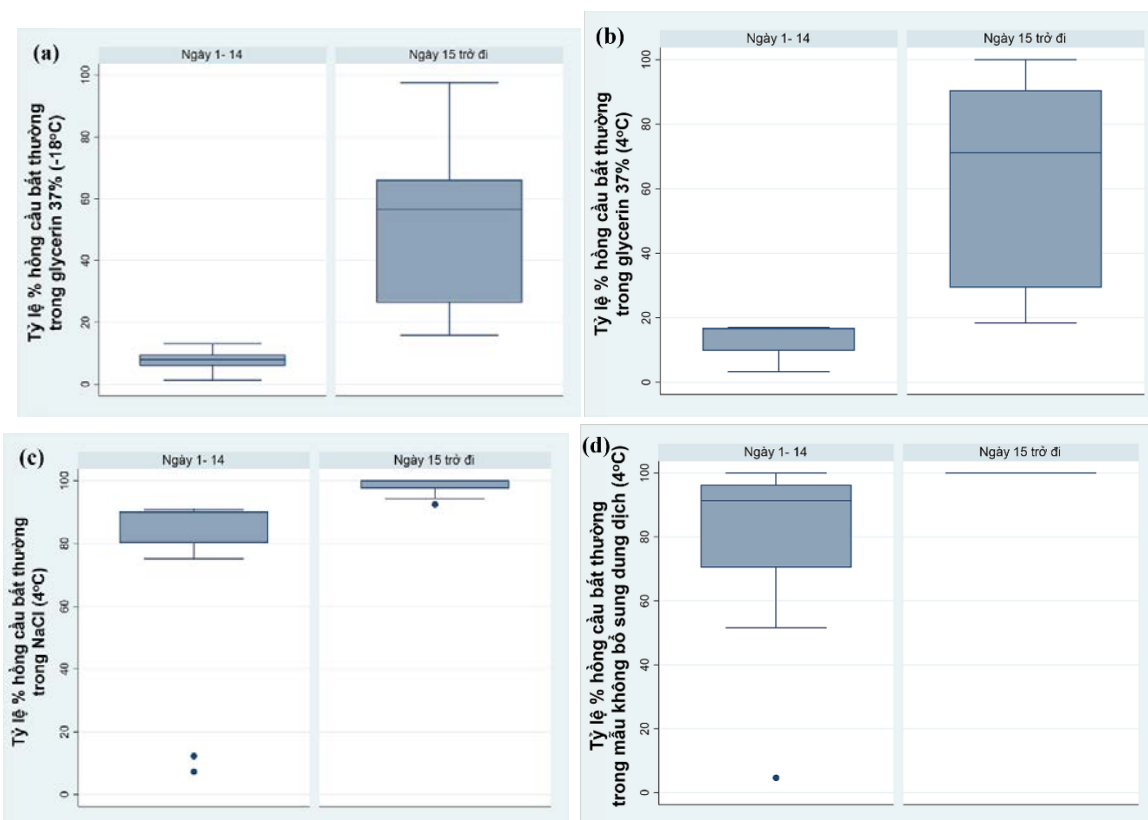
* Kiểm định Wilcoxon; p1 so sánh tỷ lệ hồng cầu thô bất thường trong glycerin 37% (-18°C) với trong các nghiệm thức: glycerin 37% (4°C), NaCl 0,6% (4°C) và không bổ sung dung dịch (4°C); p2 so sánh tỷ lệ hồng cầu thô bất thường trong glycerin 37% (4°C) với trong các nghiệm thức: NaCl 0,6% (4°C) và không bổ sung dung dịch (4°C); p3 so sánh tỷ lệ hồng cầu thô bất thường trong NaCl 0,6% (4°C) với nghiệm thức không bổ sung dung dịch (4°C).

Khi so sánh trung vị tỷ lệ hồng cầu thô bất thường ở các nghiệm thức cho thấy tỷ lệ trung vị hồng cầu thô bất thường trong glycerin 37% ở nhiệt độ -18°C có giá trị là 31,3%, thấp hơn so với ở các nghiệm thức còn lại (Bảng 3), với $p < 0,001$. Trong khi đó, trung vị tỷ lệ hồng cầu thô bất thường trong nghiệm thức không bổ sung dung dịch (ở 4°C) có giá trị cao nhất là 100%. Đồng thời, trung vị tỷ lệ hồng cầu thô bất thường trong glycerin 37% ở cả hai nhiệt độ -18°C và 4°C có giá trị lần lượt là 31,3% và 32,8%, thấp hơn ở hai nghiệm thức hồng cầu trong NaCl 0,6% (ở 4°C) và không bổ sung dung dịch ở (ở 4°C) với giá trị lần lượt là 93,3% và 100%.

Khi xem xét tỷ lệ hồng cầu bất thường theo hai nhóm ngày là từ ngày 1-14 và từ ngày 15 trở đi, cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$) về tỷ lệ hồng cầu bất thường ở các nghiệm thức (Bảng 4). Kết hợp với biểu đồ về sự phân bố tỷ lệ hồng cầu bất thường theo nhóm ngày (Hình 4) cho thấy tỷ lệ hồng cầu bất thường có giá trị thấp và ít biến động trong khoảng ngày 1-14 đối với mẫu được lưu trữ trong glycerin 37%, trong đó hồng cầu trong glycerin 37% (ở -18°C) ít có sự thay đổi hình thái hơn so với hồng cầu trong glycerin 37% (ở 4°C) với giá trị trung vị lần lượt là 8,0% và 16,6%. Tỷ lệ hồng cầu bất thường trong

NaCl 0,6% (ở 4°C) và không bổ sung dung dịch (ở 4°C) có giá trị cao với giá trị trung vị lần lượt là 90,0% và 91,3%. Tất cả các nhóm so sánh đều cho thấy có mối quan hệ với nhau về mặt thống kê với $p < 0,001$, tuy nhiên, so sánh về tỉ lệ hồng cầu bất thường giữa mẫu trong NaCl 0,6% (ở 4°C) và mẫu không bổ sung dung dịch (ở 4°C) chưa cho thấy sự tương quan về thống kê ($p = 0,295$).

Từ ngày 15 trở đi, hồng cầu trong glycerin 37% có sự thay đổi đáng kể về hình thái với việc gia tăng nhanh chóng tế bào hồng cầu bất thường. Tuy nhiên, hồng cầu trong glycerin 37% ở nhiệt độ -18°C ít có sự biến động về hình thái so với khi bảo quản trong glycerin 37% ở nhiệt độ 4°C, với $p < 0,001$. Hồng cầu trong NaCl 0,6% (ở 4°C) và không bổ sung dung dịch (ở 4°C) ít có sự biến động về tỉ lệ hồng cầu bất thường do đã đạt giá trị cao ở 14 ngày đầu khảo sát. So sánh tương quan về tỉ lệ hồng cầu bất thường ở các nhóm mẫu với nhau cho thấy có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$ ở các cặp nghiệm thức, $p = 0,015$ ở nghiệm thức trong NaCl 0,6% (ở 4°C) và không bổ sung dung dịch (ở 4°C).



Hình 4. Phân bố tỉ lệ hồng cầu bất thường theo nhóm ngày (ngày 1-14, ngày 15 trở đi)

- (a) Tỉ lệ hồng cầu bất thường trong glycerin 37% (-18°C); (b) Tỉ lệ hồng cầu bất thường trong glycerin 37% (4°C); (c) Tỉ lệ hồng cầu bất thường trong NaCl 0,6% (4°C); (d) Tỉ lệ hồng cầu bất thường trong mẫu không bổ sung dung dịch (4°C).

Bảng 4. So sánh tỉ lệ hồng cầu vỡ bất thường theo nhóm ngày (ngày 1-14, ngày 15 trở đi)

Môi trường	Tỉ lệ bất thường theo ngày (%)		p1*
	Trung vị (khoảng tứ phân vị)		
	Ngày 1-14	Ngày 15 trở đi	
Glycerin 37% (-18°C)	8,0 (5,9; 9,6)	56,5 (26,4; 66,1)	<0,001
Glycerin 37% (4°C)	16,6 (9,8; 16,8)	71,1 (29,3; 90,5)	<0,001
NaCl 0,6% (4°C)	90,0 (80,2; 90,0)	100,0 (97,6; 100,0)	<0,001
Không bổ sung dung dịch (4°C)	91,3 (70,4; 96,4)	100,0 (100,0; 100,0)	<0,001
p2**	<0,001	<0,001	
p3**	<0,001	<0,001	
p4**	<0,001	<0,001	
p5**	<0,001	<0,001	
p6**	<0,001	<0,001	
p7**	0,295	0,015	

*Kiểm định Mann Whitney, **Kiểm định Wilcoxon; p1 so sánh tỉ lệ hồng cầu vỡ bất thường trong các nghiệm thức theo hai nhóm ngày; p2 so sánh tỉ lệ hồng cầu vỡ bất thường ở từng nhóm thời gian giữa hai nghiệm thức: glycerin 37% (-18°C) và glycerin 37% (4°C); p3 so sánh tỉ lệ hồng cầu vỡ bất thường ở từng nhóm thời gian giữa hai nghiệm thức: glycerin 37% (-18°C) và NaCl 0,6% (4°C); p4 so sánh tỉ lệ hồng cầu vỡ bất thường ở từng nhóm thời gian giữa hai nghiệm thức: glycerin 37% (-18°C) và không bổ sung dung dịch (4°C); p5 so sánh tỉ lệ hồng cầu vỡ bất thường ở từng nhóm thời gian giữa hai nghiệm thức: glycerin 37% (4°C) và NaCl 0,6% (4°C); p6 so sánh tỉ lệ hồng cầu vỡ bất thường ở từng nhóm thời gian giữa hai nghiệm thức: glycerin 37% (4°C) và không bổ sung dung dịch (4°C); p7 so sánh tỉ lệ hồng cầu vỡ bất thường ở từng nhóm thời gian giữa hai nghiệm thức: NaCl 0,6% (4°C) và không bổ sung dung dịch (4°C).

Trong quá trình bảo quản, tế bào hồng cầu có sự giảm về thể tích, thay đổi độ đàn hồi của màng, thay đổi thành phần bào tương, tái tổ chức lại khung xương tế bào (Barshtein et al., 2012; Geekiyanage et al., 2020), tương ứng với sự gia tăng tỉ lệ hồng cầu vỡ bất thường theo thời gian. Kết quả khảo sát tỉ lệ hồng cầu vỡ bất thường cho thấy có sự gia tăng nhanh chóng ở các nhóm đối chứng với giá trị >90% trong 14 ngày đầu khảo sát. Việc bảo quản hồng cầu trong EDTA hay có bổ sung NaCl 0,6% cho hiệu quả bảo quản tương đương với các điều kiện bảo quản khác đã được công bố, trong đó các tổn thương lưu trữ tích lũy dần trong hai tuần đầu khi bảo quản. Chẳng hạn, nghiên cứu của Rous và Turner (Rous & Turner, 1916) bảo quản máu thỏ trong natri citrate, đường saccharose và nước trong 14 ngày và có thể được sử dụng để truyền máu; nghiên cứu của Tuo và sự (Tuo et al., 2014) ở hồng cầu người cho thấy tế bào hồng cầu khỏe mạnh chỉ quan sát được trong 14 ngày đầu lưu trữ. Hồng cầu vỡ bảo quản trong dung dịch đệm PBS ở 4°C (Công ty Rockland Immunochemical, Hoa Kỳ), hay trong đệm citrate saline ở 2-8°C (Công ty Pel-Freez Biologicals, Hoa Kỳ) được khuyến nghị sử dụng trong hai tuần. Từ ngày 15 trở đi, quan sát được ít tế bào nguyên vẹn và không thấy sự hiện diện của tế bào khỏe mạnh (Tuo et al., 2014).

Glycerin 37% cho thấy khả năng bảo quản hồng cầu tốt hơn khi tỉ lệ hồng cầu bất thường thấp trong hai tuần đầu bảo quản với giá trị <33%. Trong đó, hồng cầu trong glycerin 37% ở nhiệt độ 4°C có tỉ lệ bất thường tối đa vào ngày 42, tương đương với quy trình bảo quản hồng cầu người rộng rãi là trong chất chống đông (citrate-dextrose-phosphate), bổ sung thêm sodium, adenine, glucose, mannitol, lưu trữ ở $4 \pm 2^\circ\text{C}$ tối đa trong 42 ngày (Alessandro, Liumbruno, Grazzini, & Zolla, 2010). Ở nhiệt độ -18°C cho thấy hiệu quả bảo quản tốt hơn khi tỉ lệ hồng cầu bất thường là 97,5% vào ngày 63.

4. Kết luận

Trong quá trình lưu trữ, tế bào hồng cầu có sự tăng dần bất thường về hình thái và giảm dần về thể tích tế bào đóng gói (PCV).

Hồng cầu được bảo quản trong glycerin 37% có tốc độ biến đổi về hình thái chậm hơn so với ở các nghiệm thức đối chứng, đặc biệt ở hai tuần đầu bảo quản.

Điều kiện bảo quản trong glycerin 37% ở nhiệt độ -18°C cho thấy hiệu quả bảo quản hồng cầu tốt nhất trong các nghiệm thức thử nghiệm.

- ❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.
- ❖ **Lời cảm ơn:** Cảm ơn Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh hỗ trợ kinh phí và các điều kiện khác để chúng tôi hoàn thành nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alessandro, A. D., Liumbruno, G., Grazzini, G., & Zolla, L. (2010). Red blood cell storage: the story so far. *Blood Transfus*, 8, 82-88.
- Barshtein, G., Lijakovic, I. P., & Gural, A. (2021). Deformability of Stored Red Blood Cells. *Frontiers in Physiology*, 12, 1-13.
- Geekiyana, N., Sauret, E., Saha, S., Flower, R., & Gu, Y. (2020). Modelling of Red Blood Cell Morphological and Deformability Changes during In-Vitro Storage. *Applied sciences*, 10, 1-27.
- Melillo, A., & DVM. (2007). Rabbit clinical pathology. *Journal of exotic pet medicine*, 16(3), 135-145.
- Moore, D. M., Zimmerman, K., & Smith, S. A. (2015). Hematological Assessment in Pet Rabbits. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 18, 9-19.
- Musongong, G. A., Fakae, B. B., & Chiejina, S. N. (2003). Hematological Values of out Bred Domestic Rabbits in Eastern Nigeri. *Tropicultura*, 21(4), 186-188.
- Pasciu, V., Sotgiu, F. D., Porcu, C., & Berlinguer, F. (2021). Effect of Media with Different Glycerol Concentrations on Sheep Red Blood Cells' Viability In Vitro. *Animals*, 11, 1-12.
- Ponder, E., & Saslow, G. (1930). The measurement of red cell volume. *The Journal of Physiology*, 70(1), 267-296.
- Rogers, S. C., Dosier, L. B., McMahon, T. J., Zhu, H., Timm, D., Zhang, H., & Doctor, A. (2018). Red blood cell phenotype fidelity following glycerol cryopreservation optimized for research purposes. *Plos one*, 13(12), 1-21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209201>

- Rous, P., & Turner, J. R. (1916). The preservation of living red blood cells in vitro. *The Journal of experimental medicine*, 23(2), 239-248.
- Truong, T. K. D., Phu, C. D., Huynh, N., Nguyen, T. T. T., Mai, T. T., & Dao, N. T. (2015). Đánh giá hiệu quả sử dụng chế phẩm hồng cầu lắng đông lạnh tại Thành phố Hồ Chí Minh [Evaluation of frozen red blood cells transfusion for patients' treatment at Ho Chi Minh City]. *Ho Chi Minh City Journal of Medicine*, 19(4), 364.
- Tuo, W. W., Wang, D., Liang, W. J., & Huang, Y. X. (2014). How Cell Number and Cellular Properties of Blood Banked Red Blood Cells of Different Cell Ages Decline during Storage. *Plos one*, 9(8), 1-8.
- Washington, I. M., & Hoosier, G. V. (2012). Clinical Biochemistry and Hematology. *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*, 57-116. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380920-9.00003-1>

EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF PRESERVING RABBIT RED BLOOD CELLS IN 37% GLYCERIN AT 4°C AND -18°C IN VITRO

Nguyễn Thị Hồng Nhung, Phan Thị Phương Thanh*

University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City, Vietnam

*Corresponding author: Phan Thi Phuong Thanh – Email: phanthanhyd@gmail.com

Received: September 10, 2024; Revised: November 08, 2024; Accepted: January 18, 2025

ABSTRACT

This study investigated the storage efficiency of rabbit red blood cells (*Oryctolagus cuniculus*) in 37% glycerin at 4°C and -18°C. Changes in cell morphology and packed cell volume (PCV) were analyzed over time. The results showed that red blood cells stored at -18°C maintained greater morphological stability, with over 90% of cells remaining normal during the first two weeks. In contrast, red blood cells stored at 4°C exhibited more significant changes. These findings highlight the importance of glycerin concentration and storage temperature in preserving rabbit red blood cells, offering valuable insights for research applications.

Keywords: 37% glycerin; Packed cell volume; rabbit red blood cells; red blood cell morphology