



Роль етапу дегідратації в розвитку постгіпертонічного гемолізу еритроцитів ссавців

О. Є. Ніпот, О. О. Шапкіна, П. М. Зубов, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова

nipotel71@gmail.com

Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України,
вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61016, Україна, cyuo@online.kharkov.ua

Метою роботи було оцінити рівень пошкодження еритроцитів ссавців за умов постгіпертонічного шоку залежно від концентрації NaCl в середовищі дегідратації та визначити вплив гіпертонічних розчинів NaCl на стан еритроцитів ссавців методом проточної цитометрії. Для досягнення мети використовували спектрофотометричні та цитометричні методи дослідження. Отримані дані показали, що постгіпертонічний лізис еритроцитів ссавців залежить від концентрації NaCl у середовищі дегідратації, при цьому найчутливішими до дії постгіпертонічного шоку є еритроцити щура, найменш чутливими — клітини кролика. Цитометричні дослідження виявили значні зміни гістограм розподілу еритроцитів усіх видів ссавців за зростання концентрації солі в середовищі дегідратації. Ці зміни є видоспецифічними і, ймовірно, пов'язані зі зміною об'єму та морфології клітин. Отримані дані дозволили виявити взаємозв'язок між рівнем постгіпертонічного гемолізу та значеннями таких показників, як медіана розподілу та коефіцієнт варіації. Так, підвищення чутливості еритроцитів ссавців до постгіпертонічного шоку зі збільшенням концентрації солі і середовищі дегідратації зазвичай супроводжувалося зменшенням значення медіани розподілу клітин, а вищі значення коефіцієнту варіації характерні для еритроцитів ссавців, що є стійкими до дії постгіпертонічного шоку.

Ключові слова: еритроцити ссавців, дегідратація, постгіпертонічний шок, цитометрія, медіана розподілу, коефіцієнт варіації

Вивчення механізмів кріопшкоджень і кріозахисту, які реалізуються на різних етапах низькотемпературного консервування клітин, зокрема на етапі розморожування, залишається однією з актуальних проблем сучасної кріобіології [4]. Одним з факторів кріопшкодження, який суттєво впливає на стан еритроцитів, є концентрування сольових розчинів під час виморожування води. Вплив цього фактора може бути визначальним на етапі розморожування еритроцитів, коли в міру танення льоду умови гіпертонічного оточення клітин змінюються на ізотонічні і еритроцити внаслідок різкої зміни осмотичних умов лізують. Для вивчення цього явища використовують модель постгіпертонічного шоку. Протокол експерименту містить витримування клітин у гіпертонічних розчинах і наступне переміщення їх в ізотонічні умови [14, 15]. Сучасні уявлення про механізм постгіпертонічного шоку еритроцитів людини охоплюють пошкодження мембрани на етапі дегідратації, коли

відбувається проникнення іонів натрію з позаклітинного середовища та зв'язування їх з білковими молекулами всередині клітини. Накопичення надлишкових катіонів призводить до додаткового входу води до клітин на етапі регідратації. Як наслідок, об'єм еритроцитів збільшується і за перевищення значень критичного гемолітичного об'єму клітини руйнуються [11].

На відміну від еритроцитів людини, вивченню яких за умов кріоконсервування присвячено багато робіт [4, 9, 11, 17], еритроцити тварин за цих умов вивчені недостатньо. Порівняльні дослідження, у яких вивчено реакцію клітин різних видів ссавців на дію постгіпертонічного шоку, можуть бути важливими як для галузі кріобіології, так і в загальнобіологічному плані. Крім того, отримані результати можуть слугувати підґрунтям для формування уявлень щодо механізмів кріопшкодження еритроцитів ссавців за їх низькотемпературного консервування.

Мета роботи — вивчити рівень пошкодження еритроцитів ссавців за умов постгіпертонічного шоку залежно від концентрації NaCl в середовищі дегідратації і визначити вплив гіпертонічних розчинів NaCl на стан еритроцитів ссавців методом проточної цитометрії.

Матеріали і методи

Для дослідження використовували еритроцити, отримані з донорської крові людини (*Homo sapiens*), щура (*Rattus norvegicus*) і кролика (*Oryctolagus cuniculus*), заготовленої на гемоконсерванті «Глюгіцир» (Біофарма, Україна). Роботу з тваринами проводили відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах» (V Національний конгрес з біоетики, Київ, 2013), узгоджених з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Після видалення плазми еритромасу двічі відмивали центрифугуванням (центрифуга «ОПн-ЗУ4.2», Киргизстан) за 1000 g протягом 3 хвилин у 10-кратному об'ємі фізіологічного розчину (NaCl 0,15 моль/л; Na-фосфатний буфер 0,01 моль/л, pH 7,4). Лейкоцитарну плівку і супернатант видаляли аспірацією після кожного центрифугування. Еритроцити зберігали у вигляді щільного осаду не більше 4 годин за температури 0°C. Всі середовища приготовані на фосфатному буфері (0,01 моль/л, pH 7,4). Концентрацію розчинів контролювали вимірюванням осмоляльності на осмометрі ОМКА 1Ц 01 (Україна).

Постгіпертонічний шок здійснювали перенесенням еритроцитів з гіпертонічного розчину (етап дегідратації, 0,4–2,0 моль/л NaCl) в ізотонічний розчин (етап регідратації, 0,15 моль/л NaCl) за 37°C.

Ступінь гемолізу контролювали визначенням рівня гемоглобіну у досліджуваних зразках. Вміст гемоглобіну в супернатанті визначали спектрофотометричним методом на СФ-4А з проточною кюветою за довжини хвилі 543 нм і виражали у відсотках щодо 100%-го гемолізу еритроцитів. За 100% приймали поглинання проб, до яких додавали детергент тритон Х-100 у концентрації 0,1%.

Цитометричні дослідження проводили на проточному цитофлуориметрі «FACS Calibur» (Becton Dickinson, США). Медіану та коефіцієнт варіації визначали за даними розподілу клітин на основі показників прямого світлорозсіювання (FCS) за довжини хвилі аргонного лазера 488 нм. Під час кожного виміру прораховували 20 000 подій. Еритроцити інкубували протягом 20 хв при 37°C в розчинах NaCl (0,4–2,0 моль/л), приготованих на фосфатному буфері (0,01 моль/л, pH 7,4). Контрольні зразки еритроцитів інкубували у фізіологічному розчині (NaCl 0,15 моль/л; фосфатний буфер 0,01 моль/л, pH 7,4). Вміст клітин у зразку вимірювання 10⁶ кл/мл. Експериментальні дані об-

робляли за допомогою програми *Flowing Software 2.5.1* (Turku Bioscience, Фінляндія).

Кожен експеримент проводили не менше 6 разів з використанням двох паралельних проб. Для всіх зразків проводили обчислення середнього арифметичного значення і значення середньоквадратичної помилки ($M \pm m$). Отримані експериментальні результати статистично обробили за допомогою програми *Statistica 6.0* (StatSoft Inc., США).

Результати й обговорення

Дослідження впливу різних концентрацій NaCl в середовищі дегідратації на постгіпертонічний лізис (ПГЛ) еритроцитів ссавців показало, що пошкодження клітин спостерігали за концентрації солі в середовищі дегідратації 1,0 моль/л та вище. На рис. 1 наведені дані щодо ПГЛ еритроцитів людини і тварин залежно від концентрації хлориду натрію у середовищі дегідратації. Видно, що за умов преінкубації клітин різних ссавців в розчині 1,0 моль/л NaCl рівень гемолізу має видові особливості і перебуває в межах від $3 \pm 1,5\%$ для еритроцитів кролика до $10 \pm 2\%$ для клітин щура. Подальше збільшення концентрації солі в середовищі дегідратації призводить до підвищення рівня ПГЛ клітин. За концентрації NaCl в середовищі дегідратації 2,0 моль/л рівень ПГЛ еритроцитів людини і щура достатньо високий і складає $82 \pm 7\%$ та $93 \pm 6\%$ відповідно. Натомість для еритроцитів кролика рівень ПГЛ становить $63 \pm 8\%$. Отримані дані свідчать, що найчутливішими до дії постгіпертонічного шоку є еритроцити щура, найменш чутливими — клітини кролика.

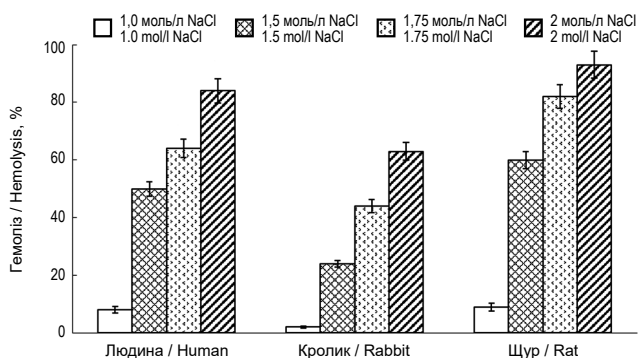


Рис. 1. Залежність постгіпертонічного гемолізу еритроцитів ссавців від концентрації солі у середовищі дегідратації за 37°C
Fig. 1. The dependence of post-hypertonic hemolysis of mammalian erythrocytes on the salt concentration in the dehydration medium at 37°C

З огляду на вищесказане, було доцільно провести порівняльну оцінку стану еритроцитів різних видів ссавців у гіпертонічних розчинах за допомогою методу проточної цитометрії. Якісна оцінка даних виявила значні зміни розподілу еритроцитів усіх видів ссавців

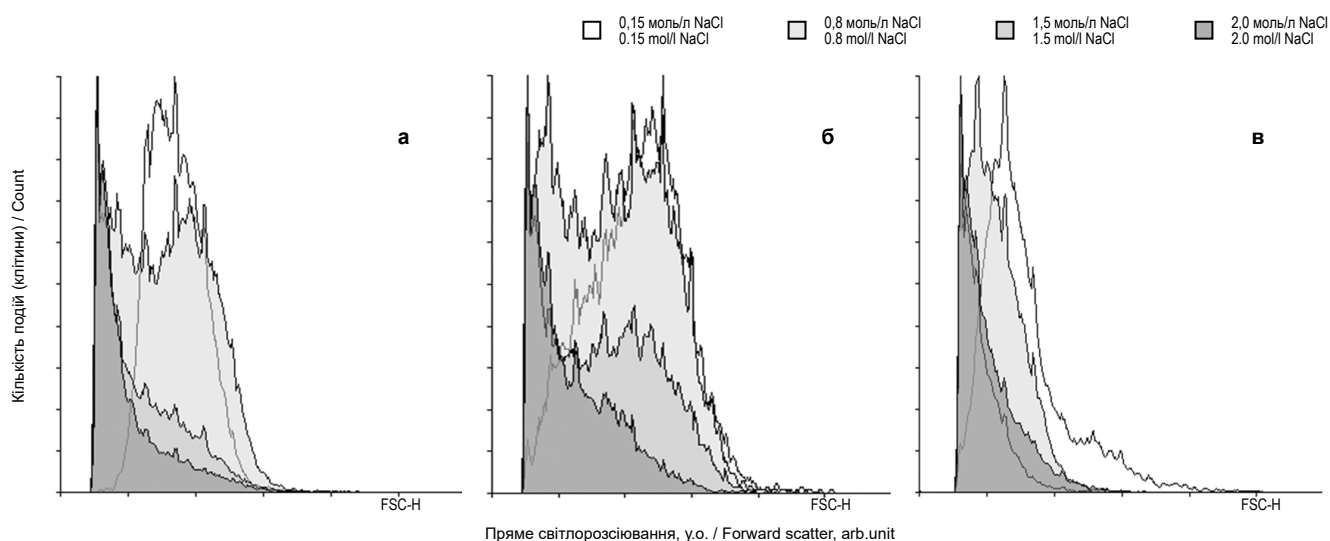


Рис. 2. Типові гістограми розподілу еритроцитів ссавців: а — людина, б — кролик, в — щур
Fig. 2. Typical histograms of mammalian erythrocyte distribution: a — human, b — rabbit, c — rat

за зростання концентрації солі в середовищі дегідратації (рис. 2). Оскільки максимальна кількість клітин, які характеризуються певним значенням світлорозсіювання, є різною для кожного вимірювання (розподілу), цей параметр нормували, взявши за одиницю максимальне значення кількості подій (клітин). Під час аналізу гістограм розподілу еритроцитів ссавців можна вказати на кілька особливостей, які можуть бути пов'язані з морфологічними характеристиками популяції клітин у певному гіпертонічному розчині. Так, за концентрації NaCl 0,8 моль/л крива розподілу еритроцитів людини і кролика має два максимуми (рис. 2а, 2б), що характерно для клітин плоскої форми [6, 7, 13, 17]; для еритроцитів щура такої особливості не спостерігають. За концентрацій NaCl 1,5 і 2,0 моль/л крива розподілу еритроцитів усіх видів ссавців поступово звужується (рис. 2), що може вказувати на формування популяції клітин сферичної форми [6, 10].

Чисельним відображенням розподілу клітин при цитометричних дослідженнях зазвичай є медіана. Її значення пропорційне ступеню розсіювання світла і сигналізує про розмір клітин та їхні морфологічні характеристики [1, 10, 13, 16]. Середні значення медіани розподілу еритроцитів досліджуваних ссавців наведені у табл. 1.

Як видно з табл. 1, контрольне значення медіани розподілу еритроцитів у фізіологічному розчині є видоспецифічним і зменшується в ряду людина > кролик > щур. Це добре узгоджується з розмірами клітин ссавців, отриманими іншими методами (мікроскопія). Так, за зменшенням значення діаметра еритроцити ссавців розташовуються в такій же послідовності (людина > кролик > щур) [2, 3, 12].

Аналізуючи отримані результати (табл. 1), можна зазначити, що у гіпертонічних середовищах значення медіани розподілу еритроцитів зазвичай менше від контрольного, що спричинене зменшенням об'єму клі-

тин внаслідок виходу води [1, 5]. З іншого боку, відомо [6, 8, 19, 13], що в гіпертонічних розчинах змінюються морфологічні характеристики клітин; це теж має вплив на значення медіани розподілу. У середовищі 0,8 моль/л NaCl (порівняно з 0,4 моль/л NaCl) еритроцити людини характеризуються морфологічною різноманітністю зі значною часткою плоских форм, що призводить до збільшення значення медіани. В розчинах, які містять 1,0 та 1,5 моль/л NaCl, значення медіани зменшується для клітин усіх ссавців, що може бути пов'язане з ростом популяції сфероцитів [16]. Цікавою особливістю еритроцитів щура, найчутливіших до постгіпертонічного шоку, є збільшення медіани у розчинах, які містять 1,75 та 2,0 моль/л NaCl — порівняно з 1,0 та 1,5 моль/л NaCl. Це може вказувати на збільшення об'єму клітин щура внаслідок порушення бар'єрної функції мембрани і входу іонів натрію усередину клітини.

Інформацію про рівень мінливості набору даних у межах розподілу надає коефіцієнт варіації. Ця метрика показує, наскільки характеристики клітин відрізняються від середнього значення (табл. 2).

Як видно з табл. 2, еритроцити щура характеризуються сталим значенням коефіцієнту варіації за зміни умов середовища, на відміну від клітин людини та кролика. Цей факт може вказувати на меншу гетерогенність популяції еритроцитів щура і, як наслідок, меншу здатність до трансформації клітин у різних гіпертонічних середовищах.

Порівнюючи між собою серії гістограм клітин досліджуваних ссавців, можна виокремити деякі особливості, які співвідносяться з рівнем чутливості еритроцитів до постгіпертонічного шоку. Еритроцити кролика, найстійкіші до постгіпертонічного шоку, характеризуються високими показниками коефіцієнта варіації у розчинах, які містять 1,0–2,0 моль/л NaCl, порівняно з еритроцитами щура. Можна припустити,

Таблиця 1. Середні значення медіани (у.о.) розподілу еритроцитів ссавців за параметром FSC (пряме розсіювання) у розчинах NaCl
Table 1. Mean values of the median (arb. unit) distribution of mammalian erythrocytes by the parameter FSC (direct scattering) in NaCl solutions

Еритроцити ссавців Mammalian erythrocytes	Концентрація NaCl, моль/л NaCl concentration, mol/l						
	0,15	0,4	0,8	1,0	1,5	1,75	2,0
Людина / Human	205±19	109±9	197±11	145±8	108±13	107±10	94±8
Кролик / Rabbit	168±14	173±12	169±15	96±11	79±7	84±6	79±9
Щур / Rat	144±18	114±12	114±11	87±9	75±14	93±5	99±11

Таблиця 2. Середні значення коефіцієнту варіації (у.о.) розподілу еритроцитів ссавців за параметром FSC (пряме розсіювання) у розчинах NaCl
Table 2. The average values of the coefficient of variation (arb. unit) of the mammalian erythrocytes distribution by the parameter FSC (direct scattering) in NaCl solutions

Еритроцити ссавців Mammalian erythrocytes	Концентрація NaCl, моль/л / NaCl concentration, mol/l						
	0,15	0,4	0,8 8	1,0	1,5	1,75	2,0
Людина / Human	30±6	44±9	46±	52±10	54±11	50±9	45±6
Кролик / Rabbit	24±5	32±8	42±6	52±7	50±12	56±11	57±7
Щур / Rat	38±2	32±8	36±3	36±4	32±5	39±5	34±3

що в популяції еритроцитів кролика навіть у високо-концентрованому сольовому розчині зберігається частина клітин несферичної форми, стійких до постгіпертонічного шоку. Водночас ймовірно, що для клітин щура частка сфероцитів, які зазнають пошкодження під час переміщення клітин із гіпертонічних в ізотонічні умови, є вагомішою.

Висновки

Еритроцити ссавців мають різний рівень постгіпертонічного пошкодження і за зменшенням чутливості до постгіпертонічного шоку їх можна розташувати у послідовності щур > людина > кролик. Рівень постгіпертонічного лізису залежить від концентрації NaCl у середовищі дегідратації. Для еритроцитів різних видів ссавців спостерігається взаємозв'язок між рівнем постгіпертонічного гемолізу та значеннями таких показників, як медіана розподілу і коефіцієнт варіації. Зменшення значення медіани розподілу клітин зазвичай супроводжується підвищенням чутливості еритроцитів ссавців до постгіпертонічного шоку. Винятком є еритроцити щура, для яких отримані значення медіани у досліджуваному концентраційному ряді NaCl мають мінімум за 1,5 моль/л. Що стосується коефіцієнту варіації, то вищі значення цього параметра характерні для еритроцитів ссавців, котрі є стійкими до дії постгіпертонічного шоку.

Отже, залучаючи різнопланові модельні дослідження, можна краще зрозуміти процеси, які відбува-

ються у реальних умовах, і розробити удосконалення до протоколів кріоконсервування клітин.

Перспективи подальших досліджень

У подальших дослідженнях планується використовувати цитометричний аналіз для оцінки стану клітин в умовах замороження-відтавання та модельних експериментів на зразок постгіпертонічного шоку із залученням флуоресцентних міток, які зв'язуються з фосфатидилсерином, для оцінки стану мембрани еритроцитів ссавців.

- Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A Flow cytometry: basic principles and applications. *Critic. Rev. Biotechnol.* 2017; 37 (2): 163–176. DOI: 10.3109/07388551.2015.1128876.
- Ameri M, Schnaars HA, Sibley JR, Honor DJ. Stability of hematologic analytes in monkey, rabbit, rat, and mouse blood stored at 4°C in EDTA using the ADVIA 120 hematology analyzer. *Vet. Clin. Pathol.* 2011; 40 (2): 188–193. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2011.00304.x.
- Betticher DC, Geiser J. Resistance of mammalian red blood cells of different size to hypertonic milieu. *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.* 1989; 93 (2): 429–432. DOI: 10.1016/0300-9629(89)90061-3.
- Bojic S, Murray A, Bentley BL, Spindler R, Pawlik P, Cordeiro JL, Bauer R, de Magalhães JP. Winter is coming: the future of cryopreservation. *BMC Biol.* 2021;19 (1): 56. DOI: 10.1186/s12915-021-00976-8.
- García JM, Ardila AM. Cell volume variation under different concentrations of saline solution (NaCl). *Rev. Colomb. Anestesiol.* 2009; 37 (2): 101–105. DOI: 10.1016/S0120-3347(09)72002-7.

6. Ghosh S, Chakraborty I, Chakraborty M, Mukhopadhyay A, Mishra R, Sarkar D. Evaluating the morphology of erythrocyte population: An approach based on atomic force microscopy and flow cytometry. *Biochim. Biophys. Acta*. 2016; 1858 (4): 671–681. DOI: 10.1016/j.bbame.2016.01.021.
7. Gienger J, Gross H, Ost V, Bär M, Neukammer J. Assessment of deformation of human red blood cells in flow cytometry: measurement and simulation of bimodal forward scatter distributions. *Biomed. Opt. Exp.* 2019; 10 (9): 4531–4550. DOI: 10.1364/BOE.10.004531.
8. Gorey A, Biswas D, Kumari A, Gupta S, Sharma N, Chen GCK, Vasudevan S. Application of continuous-wave photoacoustic sensing to red blood cell morphology. *Laser. Med. Sci.* 2019; 34: 487–494. DOI: 10.1007/s10103-018-2621-7.
9. Lahmann JM, Benson JD, Higgins AZ. Concentration dependence of the cell membrane permeability to cryoprotectant and water and implications for design of methods for post-thaw washing of human erythrocytes. *Cryobiol.* 2018; 80: 1–11. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2017.12.003.
10. Mishra Ragh, Sarkar D, Bhattacharya S, Mallick S, Chakraborty M, Mukherjee D, Kar M, Mishra Rosh. Quantifying morphological alteration of RBC population from light scattering data. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2015; 59 (4): 287–300. DOI: 10.3233/CH-131726.
11. Muldrew K. The salting-in hypothesis of post-hypertonic lysis. *Cryobiol.* 2008; 57 (3): 251–256. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2008.09.007.
12. Nemeth N, Sogor V, Kiss F, Ulker P. Interspecies diversity of erythrocyte mechanical stability at various combinations in magnitude and duration of shear stress, and osmolality. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2016; 63 (4): 381–398. DOI: 10.3233/CH-152031.
13. Piagnerelli M, Zouaoui Boudjeltia K, Brohee D, Vereerstraeten A, Piro P, Vincent JL, Vanhaeverbeek M. Assessment of erythrocyte shape by flow cytometry techniques. *J. Clin. Pathol.* 2007; 60 (5): 549–554. DOI: 10.1136/jcp.2006.037523.
14. Semionova KA, Nipot OE, Yershova NA, Shapkina OO, Shpakova NM. Temperature, osmolality, and glucose determine the erythrocyte resistance to post-hypertonic stress. *Rep. Nat. Acad. Sci. Ukr.* 2020; 4: 99–106. DOI: 10.15407/dopovid2020.04.099. (in Ukrainian)
15. Semionova KA, Yershova NA, Yershov SS, Orlova NV, Shpakova NM. Peculiarities of posthypertonic lysis in erythrocytes of several mammals. *Probl. Cryobiol. Cryomed.* 2016; 26 (1): 73–83. DOI: 10.15407/cryo26.01.073. (in Russian)
16. Yamamoto A, Saito N, Yamauchi Y, Takeda M, Ueki S, Itoga M, Kojima K, Kayaba H. Flow cytometric analysis of red blood cell osmotic fragility. *J. Lab. Automat.* 2014; 19 (5): 483–487. DOI: 10.1177/2211068214532254.
17. Zemlyanskykh NG, Kovalenko IF, Babichuk LA. Peculiarities of modifications in geometric parameters and changes in osmotic fragility of human erythrocytes following their exposure in sucrose and PEG-1500 solutions. *Probl. Cryobiol. Cryomed.* 2017; 27 (4): 296–310. DOI: 10.15407/cryo27.04.296. (in Russian)

The role of the dehydration stage in the post-hypertonic hemolysis of mammalian erythrocytes

O. E. Nipot, O. O. Shapkina, P. M. Zubov, N. V. Orlova, N. M. Shpakova
nipotel71@gmail.com

Institute of Problems of Cryobiology and Cryomedicine NAS of Ukraine,
23 Pereyaslavska str., Kharkiv, 61016, Ukraine, cryo@online.kharkov.ua

The aim of this study was to assess the level of damage to mammalian erythrocytes under post-hypertonic shock depending on the concentration of NaCl in the dehydration medium and to determine the effect of hypertonic NaCl solutions on the condition of mammalian erythrocytes by flow cytometry. To achieve this goal, spectrophotometric and cytometry research methods were used. The data obtained showed that post-hypertonic lysis of mammalian erythrocytes depends on the concentration of NaCl in the dehydration medium. The most sensitive to the effects of post-hypertonic shock are rat erythrocytes, the least sensitive are rabbit cells. Cytometry studies revealed significant changes in the histograms of the distribution of erythrocytes of all mammalian species with increasing salt concentration in the dehydration medium. These changes are species-specific and are probably related to changes in cell volume and morphology. The data revealed a relationship between the level of post-hypertonic hemolysis and the values of such indicators as the median distribution and the coefficient of variation. Thus, an increase in the sensitivity of mammalian erythrocytes to post-hypertonic shock with increasing salt concentration in dehydration medium was usually accompanied by a decrease in the median cell division, and higher values of the coefficient of variation are characteristic of mammalian erythrocytes resistant to post-hypertonic shock.

Key words: mammalian erythrocytes, dehydration, post-hypertonic shock, cytometry, median, coefficient of variation, distribution