

Гипертоническая устойчивость фетальных эритроцитов человека в электролитной среде

Л.Г. КУЛЕШОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Hypertonic Resistance of Human Fetal Erythrocytes in Electrolyte Medium

KULESHOVA L.G.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Методом спектрофотометрии изучали кинетику накопления свободного гемоглобина в супернатантах после экспозиции фетальных эритроцитов человека в гипертонических растворах NaCl. Показано, что повышенная по сравнению с эритроцитами взрослых доноров длительная устойчивость (60 мин) фетальных эритроцитов к гиперосмотическому воздействию до 2,3 М может быть обусловлена наличием в фетальной крови значительного количества молодых эритроцитарных форм.

Ключевые слова: спектрофотометрия, фетальные эритроциты, электролит, гипертония, гемолиз.

Методом спектрофотометрії вивчали кінетику накопичення вільного гемоглобіну в супернатантах після експозиції фетальних еритроцитів людини в гіпертонічних розчинах NaCl. Показано, що підвищена в порівнянні з еритроцитами дорослих донорів тривала стійкість (60 хв) фетальних еритроцитів до гіперосмотичної дії до 2,3 М може бути зумовлена наявністю в фетальній крові значної кількості молодих еритроцитарних форм.

Ключові слова: спектрофотометрія, фетальні еритроцити, електроліт, гіпертонія, гемоліз.

Using the method of spectrophotometry there was studied the kinetics of free hemoglobin accumulation in supernatants after exposure of human fetal erythrocytes in NaCl hypertonic solutions. There was demonstrated that an increased, if compared with the adult donor's erythrocytes long-term resistance, (60 min) of fetal erythrocytes to hyperosmotic effect up to 2.3 M could be stipulated by the presence in fetal blood of a considerable amount of young forms of erythrocyte.

Key-words: spectrophotometry, fetal erythrocytes, electrolyte, hypertension, hemolysis.

Гипертонический криогемолиз эритроцитов человека является следствием сочетанного воздействия на клетки охлаждения и высококонцентрированных внеклеточных растворов. Экспериментальное моделирование данной криобиологической ситуации дает возможность оценить роль каждого указанного стрессового фактора в криоповреждении клеток.

Гипертонический криогемолиз эритроцитов взрослых доноров (далее донорских эритроцитов) исследован достаточно обстоятельно, что позволило сформулировать биофизическую модель этого явления, объясняющую основные его закономерности [6, 11].

Фетальная кровь по основным количественным характеристикам параметрам (гематокрит, средний объем эритроцитов, плотность, вязкость, содержание гемоглобина и др.), а также агрегационным и реологическим свойствам значительно отличается от крови взрослых доноров. Так, количество эритроцитов в фетальной крови в среднем в 1,3 раза выше, чем в цельной крови взрослого человека, и составляет $5,0 \times 10^6 - 7,5 \times 10^6$ в 1 мм^3 . Это в свою очередь обуславливает повышенные значения

Hypertonic cryohemolysis of human erythrocytes is the result of a combined effect on cells of cooling and highly concentrated extracellular solutions. Experimental modelling of this cryobiological situation provides the possibility to estimate the role of each mentioned stress factor in cell cryodamaging.

Hypertonic cryohemolysis of adult donor's erythrocytes (herein after donor's erythrocytes) was studied quite thoroughly, that allowed to define a biophysical model of this phenomenon, explaining its basic regularities [6, 11].

Fetal blood on the main quantitative characteristics (hematocrit, erythrocyte average volume, density, viscosity, hemoglobin content etc.), as well as by aggregative and rheological properties considerably differs from the adult donor's blood. Thus, the number of erythrocytes in fetal blood is in average in 1.3 times higher, than in the adult's whole blood, and makes $5.0 \times 10^6 - 7.5 \times 10^6$ in 1 mm^3 . This, in its turn, stipulates an increased value of such indices of fetal blood, as hematocrit ($66.20 \pm 1.23\%$), hemoglobin content (21-25%), density (1.06-1.08 g/ml). The erythrocyte sedimentation rate is very low (1 mm/hr) in fetal blood due to a high importance of hematocrit, a comparatively

Адрес для корреспонденции: Кулешова Л.Г. Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-88-71, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Kuleshova L.G., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7728871, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

таких показателей фетальной крови, как гематокрит ($66,20 \pm 1,23\%$), содержание гемоглобина (21-25%), плотность (1,06-1,08 г/мл). Благодаря высокому значению гематокрита, сравнительно низкому содержанию глобулинов и слабой агрегационной способности в фетальной крови очень мала скорость оседания эритроцитов (1 мм/ч) [2,3,19].

В клиническом аспекте криоконсервированные фетальные эритроциты рассматриваются как гемотрансфузионная среда [17]. Поэтому с точки зрения криобиологических приложений [7] важно оценить, отражаются ли морфофункциональные особенности фетальной крови прежде всего на гипертоническом криогемолизе клеток.

Целью данной работы явился анализ первой стадии гипертонического криогемолиза, а именно исследование устойчивости эритроцитов фетальной крови человека к гипертоническому стрессу в зависимости от времени его действия при комнатных температурах.

Материалы и методы

Фетальную кровь получали от здоровых рожениц на консерванте "Глюгидир" (рис.1). Материалом исследований служила фетальная эритро-масса. Для ее получения цельную фетальную кровь 3-кратно отмывали от плазмы, разрушенных клеток и консерванта 0,15 М раствором NaCl общепринятым способом [18], а затем полностью удаляли надосадок. Концентрацию клеток в уплотненной фетальной эритро-массе контролировали, определяя гематокритное число стандартным методом [10,19]. Исходный гематокрит составлял 99,0%. Дальнейшие исследования проводили при одинаковом гематокрите, что достигали разведением уп-лотненной фетальной эритро-массы исследуемым раствором в соотношении 1:10. Исследован следующий концентрационный ряд водных растворов NaCl: 0,15 М (286 мОсм/л), 0,45 М (840 мОсм/л), 1,2 М (2300 мОсм/л), 1,4 М (2600 мОсм/л), 2,3 М (4250 мОсм/л), 3,42 М (более 4500 мОсм/л). Осмотическое давление растворов определяли по экстраполированной кривой, построенной по данным микроосмометра ОМКА-Ц-01. Свободный гемоглобин в супернатантах после гипертонического воздействия на клетки измеряли спектрофотометрически в области 410 нм (полоса Соре, соответствующая характеристическому поглощению гемоглобина) на спектрофотометре СФ-26. Концентрацию гемоглобина выражали в мг% или в процентах по отношению к 100%-му гемолизу. Для построения градуировочной кривой уп-лотнен-ную фетальную эритро-массу полностью гемолизи-ровали, подвергая ее 3-кратному циклу замораживания-отогрева. Из полученного гемо-

low content of globulins and a weak aggregation capability [2, 3, 19].

In a clinical aspect the cryopreserved fetal erythrocytes are considered as a hemotransfusion medium [17]. Therefore from the point of view of cryobiological applications [7] it is important to estimate whether the morphofunctional peculiarities of fetal blood primarily affect the cell hypertonic cryo-hemolysis.

The aim of this work was to analyse the first stage of hypertonic cryohemolysis, namely, the study of the resistance of human fetal blood erythrocytes to hypertonic stress depending on time of its effect under room temperatures.

Materials and methods

Fetal blood was procured from healthy women in birth with "Glugicyr" preservative (Fig. 1). Fetal erythromass served as the material for study. For its procurement the whole fetal blood was thrice washed-out from plasm, destroyed cells and preservative with 0.15 M NaCl solution using the routine method [18], afterwards the supernatant was completely removed. Cell concentration in a condensed fetal erythromass was controlled, by determining a hematocrit number using the standard method [10, 19]. Initial hematocrit made 99.0%. Further investigations were carried-out at a similar hematocrit, that was achieved by diluting a condensed fetal erythromass with the studied solution in 1:10 ratio. The following series of NaCl aqueous solution was investigated: 0.15 M (286 mOsm/l), 0.45 M (840 mOsm/l), 1.2 M (2300 mOsm/l), 1.4 M (2600 mOsm/l), 2.3 M (4250 mOsm/l), 3.42 M (more 4500 mOsm/l). Osmotic pressure of solutions was determined by the extrapolated curve, built according to the data of ОМКА-С-01 microosmometer. Free hemoglobin in

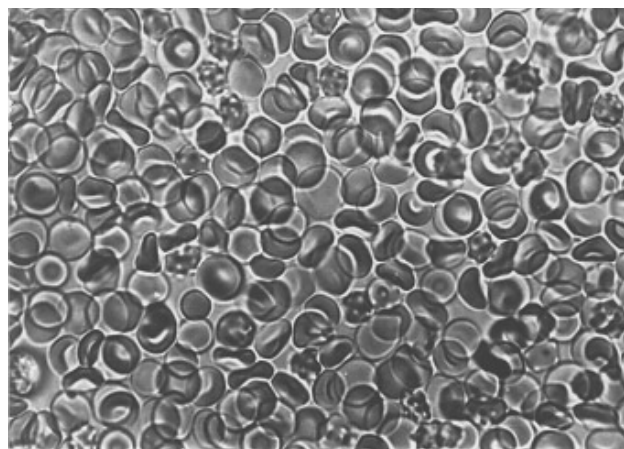


Рис. 1. Суспензия свежeweделенной фетальной крови человека в поле зрения светового микроскопа ($\times 200$).

Fig. 1. Suspension of freshly isolated human fetal blood in the visual field of light microscope ($\times 200$).

лизата соответствующим разведением готовили растворы с известной концентрацией гемоглобина в них (мг%). При этом учитывали, что гематокрит цельной фетальной крови составляет $66,20 \pm 1,23\%$, а содержание общего гемоглобина – $21,0-25,0$ г%. Таким образом, в уплотненной фетальной эритро-массе с гематокритом $99,0\%$ содержится около 32 г% гемоглобина.

В эксперименте уплотненную фетальную эритро-массу смешивали в объемном соотношении $1:10$ (1мл эритро-массы + 9 мл реагента) с гипертоническими растворами NaCl. После 5, 10, 15, 30 и 60 мин экспозиции при температуре 20°C образцы центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость снимали и фотометрировали, помещая в канал сравнения спектрофотометра соответствующие растворы реагентов, не содержащие клеток. В контроле фетальные эритроциты инкубировали в течение того же времени в физиологическом растворе NaCl.

При статистической обработке результатов использовали традиционный метод определения стандартного отклонения.

Кривые кинетики накопления свободного гемоглобина в супернатантах в зависимости от гипертоничности среды и времени экспозиции клеток в ней были получены аппроксимацией экспериментальных данных методом наименьших квадратов по стандартной программе с автоматическим выбором степени полинома [8]. Критерием степени выраженности гипертонического стресса фетальных эритроцитов был выбран уровень свободного гемоглобина в надосадке криоконсервированной донорской крови человека после отмывки от глицерина, допускаемый при трансфузии, а именно 200 мг% [18]. Эритроцитарная взвесь с таким количеством свободного гемоглобина не вызывает у реципиента негативных реакций и осложнений.

Результаты и их обсуждение

Анализ кинетических кривых (рис. 2) показал, что при увеличении гипертоничности среды и времени экспозиции клеток в ней уровень свободного гемоглобина закономерно возрастает. Однако в течение 60-минутного воздействия на клетки гипертонических растворов NaCl с концентрацией до $2,3$ М критический уровень свободного гемоглобина не достигается. Так, в контроле после 60 мин экспозиции в надосадке содержится $13,2 \pm 1,8$ мг% гемоглобина. Уровень свободного гемоглобина в $0,45$ М растворе NaCl составляет $14,5 \pm 2,0$ мг%. В $1,2$ и $1,4$ М растворах NaCl, осмотичность которых превосходит изотоническую соответственно в 8 и 9 раз, уровень

супернатантов after hypertonic effect on cells was spectrophotometrically measured in 410 nm range (Soret band, corresponding to the characteristic hemoglobin sorption) with SP-26 spectrophotometer. Hemoglobin concentration was presented in mg% or in percents in respect to 100 hemolysis. In order to build the calibration curve the condensed fetal erythro-mass was completely hemolysed, by subjecting to a threefold freeze-thawing cycle. From the obtained hemolysate by corresponding dilution there were prepared the solutions of known hemoglobin concentration in them (mg%). At the same time it was taken into account, that the hematocrit of the whole fetal blood made $66,20 \pm 1,23\%$, but the content of total hemoglobin was $21,0-25,0$ g%. Thus, in a condensed fetal erythro-mass with $99,0\%$ hematocrit there are about 32 g% of hemoglobin.

In the experiment the condensed fetal erythro-mass was mixed in the $1:10$ volume ratio (1 ml of erythro-mass + 9 ml of reagent) with NaCl hypertonic solutions. After 5, 10, 15, 30 and 60 min of exposure under 20°C the samples were centrifuged during 15 min at 3000 rotation/min. The supernatant liquid was removed and photometrically analysed, by placing into the spectrophotometer channel of comparing the corresponding reagent solutions without cells. In the control the fetal erythrocytes were incubated during the same time in NaCl physiological solution.

When statistically processing the results the routine method for the standard deviation determining was used.

The kinetics curves of free hemoglobin accumulation in supernatants depending on the medium hypertonicity and time of cell exposure in it were obtained by approximating the experimental data using the method of least squares according to the standard program with the automatic choice of polynomial degree [8]. As the criterion of manifestation degree for fetal erythrocyte hypertonic stress was selected the level of free hemoglobin in supernatant of human cryopreserved donor blood after washing-out from glycerol, admissible for transfusion, namely 200 mg% [18]. Erythrocyte suspension with such number of free hemoglobin does not cause negative reactions and complications in a recipient.

Results and discussion

The analysis of kinetic curves in Fig. 2 demonstrated, that when increasing the medium hypertonicity and the exposure time of cells in it, there was a regular augmentation of free hemoglobin level. However when affecting the cells with NaCl hypertonic solutions under concentration up to 2.3 M for 60 min, the critical level of free hemoglobin is not achieved. Thus, in the control after 60 min exposure there are 13.2 ± 1.8 mg% of hemoglobin in supernatant. The level of free hemoglobin

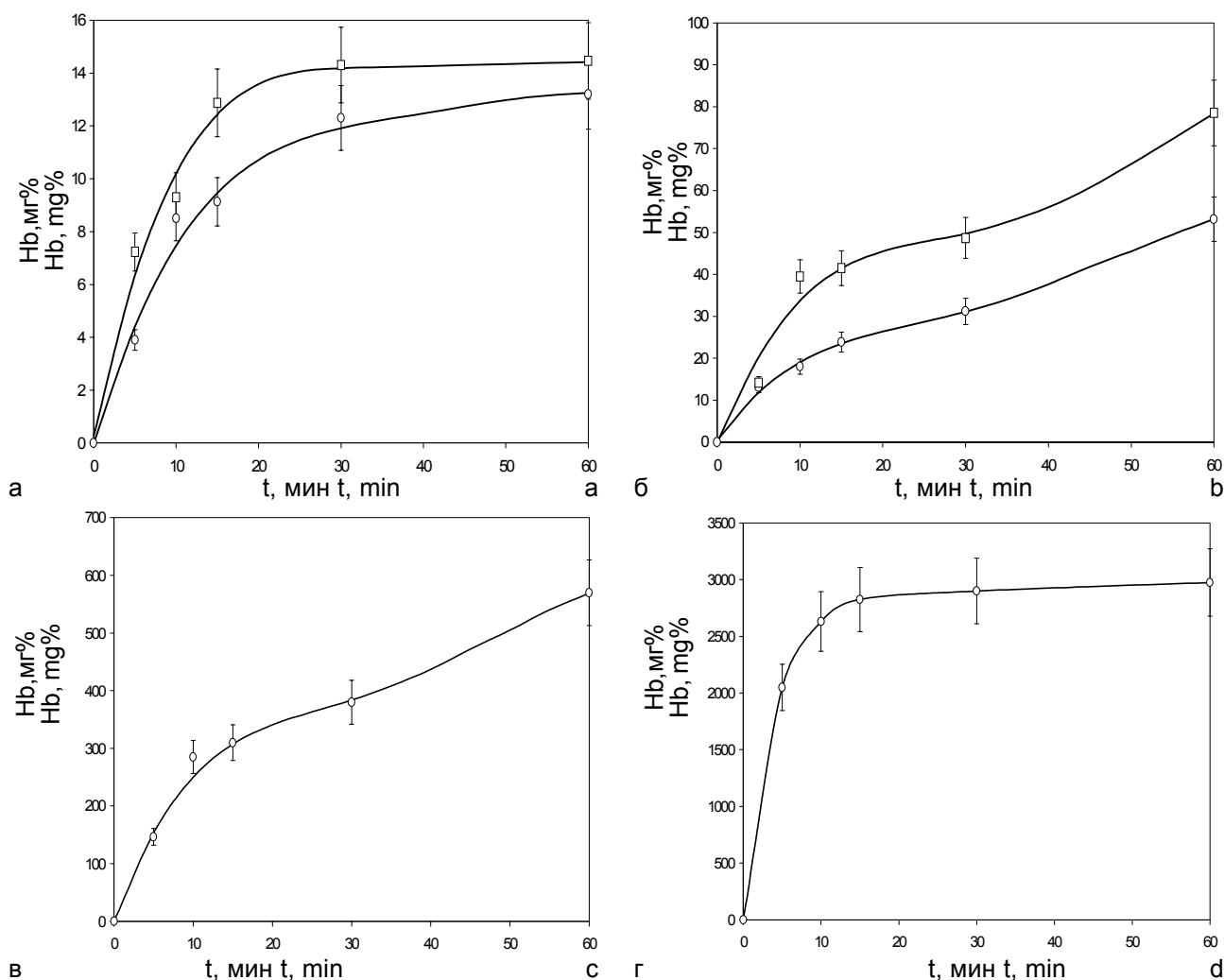


Рис. 2. Кинетика накопления свободного гемоглобина в супернатанте при экспозиции фетальных эритроцитов человека в гипертонических растворах NaCl: а) ○ – контроль 0,15 М; □ – 0,45 М; б) ○ – 1,2 М; □ – 1,4 М; в) ○ – 2,3 М; г) ○ – 3,42 М.

Fig. 2. Kinetics of free hemoglobin accumulation in supernatant during exposure of human fetal erythrocytes in NaCl hypertonic solutions: а) ○ – control 0,15 M; □ – 0,45 M; б) ○ – 1,2 M; □ – 1,4 M; в) ○ – 2,3 M; д) ○ – 3,42 M.

свободного гемоглобина составляет $53,20 \pm 7,20$ и $78,50 \pm 8,25$ мг%. Лишь при 15-кратном превышении изотонического давления в 2,3 М растворе NaCl критический уровень свободного гемоглобина достигается через 7 мин гипертонического воздействия, а к концу изотермической экспозиции уровень свободного гемоглобина составляет 570 ± 15 мг% или 17,8%. В 3,42 М растворе NaCl количество свободного гемоглобина в супернатанте практически в 10 раз превышает критический уровень уже после 5 мин действия на клетки реагента и к 15-й минуте реакции отмечается 90%-й гемолиз.

Дифференцированием экспериментальных кривых (рис.2) были получены данные о скорости накопления свободного гемоглобина – важной характеристике динамики развития гипертонического гемолиза фетальных эритроцитов. Как видно из приведенных в таблице данных, эта

in 0.45 M NaCl solution makes 14.5 ± 2.0 mg%. In 1.2 and 1.4 M NaCl solutions, whose osmolarity exceeds the isotonic one in 8 and 9 times correspondingly, the level of free hemoglobin makes 53.20 ± 7.20 and 78.50 ± 8.25 mg%. Only during a 15-fold exceeding of isoosmotic pressure in 2.3 M NaCl solution the critical level of free hemoglobin is achieved in 7 min after hypertonic effect, and to the end of isothermal exposure the level of free hemoglobin makes 570 ± 15 mg% or 17.8%. In 3.42 M NaCl solution the number of free hemoglobin in supernatant practically in 10 times exceeds the critical level even after 5 min effect of reagent on cells and to the 15th minute of the reaction the 90% hemolysis is noted.

When differentiating the experimental curves (Fig.2) there were obtained the data about the accumulation rate of free hemoglobin: an important characteristic of dynamics for hypertonic hemolysis development in fetal erythrocytes. As the Table data

скорость уменьшается во времени. Она максимальна в первые 5 мин гипертонического воздействия и зависит от осмотичности реагента. Наличие быстрой и медленной фазы гипертонического гемолиза независимо от того, осуществляется ли гемолиз быстро (высокая гипертония) или медленно (умеренная гипертония), свидетельствует о том, что суспензия фетальных эритроцитов представляет собой гетерогенную систему, в которой устойчивость клеток к гипертоническому воздействию различна.

Ранее нами [13,15] методом световой микроскопии показано, что в неизотонических растворах NaCl, несмотря на значительное обезвоживание и выраженную деформацию донорских эритроцитов, они проявляют существенную гипертоническую устойчивость: 50%-й гемолиз отмечается в 3,42 М растворе NaCl к 3-й минуте реакции. Подсчитывая число эритроцитов после гипертонического воздействия в камере Горяева, Голованов М.В. [4], также показал, что донорские эритроциты практически не разрушаются в течение 60 мин в растворах, содержащих NaCl до 7,5% (1,28 М). Выше этого уровня количество разрушенных клеток увеличивается и при экспозиции в течение 60 мин в 15%-м растворе NaCl (2,56 М) их число составляет 22,0%. По данным [24], при осмотичности внеклеточного раствора NaCl, равного 4000 мОсм/л (2,16 М), при изотермической экспозиции донорских эритроцитов в течение того же времени гемолиз возрастает до 25%. В 4,0 М растворе NaCl лизис клеток развивается в течение 2-х минут и достигает 90% [14].

Оценивая уровень гемолиза донорских и фетальных эритроцитов человека в одинаковых экспериментальных условиях (при внеклеточной осмотичности 4250 мОсм/л и изотермической экспозиции в течение 60 мин), можно констатировать, что фетальные эритроциты человека проявляют тенденцию к более высокой устойчивости к гипертонии (26,56% [24], 21,52% [4] – гемолиз донорских эритроцитов и 17,8% - гемолиз фетальных эритроцитов).

Как свидетельствуют литературные данные, фетальные эритроциты и эритроциты взрослых доноров проявляют различную устойчивость как к гипотоническим растворам NaCl (осмотическая резистентность), так и к кислотным гемолитикам (кислотная резистентность). Амплитуда осмотической резистентности донорских эритроцитов в норме составляет 12-20, фетальных – 18-28 [19]. Кислотные эритрограммы для фетальной крови также более широкие во временном диапазоне [16]. Популяция фетальных эритроцитов неоднородна по кислотной резистентности: имеется достаточно большое количество среднестойких кле-

Скорость накопления свободного гемоглобина (в мг %/мин) в супернатанте в зависимости от времени экспозиции (t, мин) фетальных эритроцитов человека в гипертонических растворах NaCl

Accumulation rate of free hemoglobin (mg%/min) in supernatant depending on the exposure time of human fetal erythrocytes in NaCl hypertonic solutions

Концентрация NaCl, М NaCl concentration, M	Время экспозиции, мин Exposure time, min				
	5	10	15	20	25
0,15	0,71	0,47	0,30	0,18	0,10
0,45	0,92	0,55	0,30	0,13	0,04
1,2	1,72	1,06	0,66	0,48	0,45
1,4	3,28	1,92	1,04	0,55	0,37
2,3	23,33	14,03	8,15	5,03	4,01

show, this rate decreases with time. It is maximum during the first 5 min of hypertonic effect and depends on osmotic reagent. The presence of rapid and slow phase of hypertonic hemolysis, independently on the fact whether hemolysis proceeds quickly (high hypertension) or slowly (moderate hypertension), testifies to the fact, that the suspension of fetal erythrocytes represents a heterogeneous system, where a cell resistance to hypertonic effect is different.

Previously using the method of light microscopy we demonstrated [13, 15], that in non-isotonic NaCl solutions, in spite of a considerable dehydration and a manifested deformation of donor's erythrocytes, they manifested a considerable hypertonic resistance: 50% hemolysis was noted in 3.42 M NaCl solution to the 3rd min of reaction. When counting the erythrocyte number after hypertonic effect in Goryaev's chamber, Golovanov M.V. [4] demonstrated as well, that donor's erythrocytes were not practically destroyed during 60 min in the solutions, containing NaCl up to 7.5% (1.28 M). Higher than this level the number of destroyed cells increases even at the exposure for 60 min in 15% NaCl solution (2.56 M), their number makes 22.0%. According to the data [24], at the osmotic rate of NaCl extracellular solution, equal to 4000 mOsm/l (2.16 M), at the isothermal exposure of donor's erythrocytes during the same time the hemolysis increases up to 25%. In 4.0 M NaCl solution the cell lysis develops during 2 min and achieves 90% [14].

When estimating the hemolysis level of donor's and fetal human erythrocytes under the similar experimental conditions (at the extracellular osmolarity of 4250 mOsm/l and isothermal exposure during 60 min), we can state, that the human fetal erythrocytes manifest the tendency to higher resistance to hypertension (26.56% [24], 21.52% [4] for donor

ток ($48,4 \pm 0,52\%$), клеток с повышенной стойкостью ($41,6 \pm 0,41\%$) и высокостойких ($2,5 \pm 0,12\%$). Аналогичное распределение для донорских эритроцитов следующее: среднестойких – $58,3 \pm 1,04$, с повышенной стойкостью – $22,2 \pm 0,47$, высокостойких – $0,4 \pm 0,01\%$ [2]. Таким образом, высокостойких клеток в фетальной крови в 6 раз больше, чем в донорской.

Анализ морфоэритрограмм фетальной крови свидетельствует о ее полиморфизме и выраженном анизцитозе. Для фетальной крови характерно наличие нормоцитов, макроцитов, микроцитов, ретикулоцитов, встречаются ядродержащие формы, нормобласты, макробласты [3, 19]. Распределение фетальных эритроцитов по индексу сферичности носит полимодальный характер и представляет собой сумму распределений нескольких субпопуляций. Имеется максимум для клеток с индексом сферичности $1,37 \pm 0,075$, который наиболее близок к максимуму на кривых взрослых доноров ($1,38-1,58$ – нормоциты). Количество уплощенных клеток с индексом сферичности в диапазоне $1,6-2,3$ составляет порядка 14% , что существенно выше, чем для взрослых доноров (около 8%) [5]. К таким уплощенным формам, прежде всего, относятся юные эритроциты-ретикулоциты или “макро-паноциты”, для которых отношение диаметра к толщине составляет $4,1$, в то время как для нормоцитов этот показатель равен $3,6$ [12]. Высокая осмотическая устойчивость отмечается именно при увеличении отношения площади мембраны эритроцитов к его объему [10]. Чем больше эритроцит, т.е. чем более выражена его макропляция, тем больше запас для его набухания в гипотонической среде и тем позднее произойдет его гемолиз.

При разделении популяции донорских эритроцитов по плотности в градиенте фикола с последующей инкубацией каждого слоя с сублитическими дозами лизофосфатидов было показано, что именно молодые клетки оказались самыми стойкими [23]. Структурно-функциональное состояние мембран молодых эритроцитов характеризуется достаточно высокой устойчивостью. Так, уровень малонового диальдегида (МДА), который отражает активность перекисного окисления липидов, в мембранах фетальных эритроцитов составляет $2,53 \pm 0,21$ нМ/ 10^6 эр, общих липидов – $173,0 \pm 31,6$ мкг/ 10^6 эр, общего фосфора – $7,69 \pm 0,41$ мкг 10^6 эр, перекиси водорода – $11,59 \pm 1,81$ мМ/ 10^6 эр. Коэффициент устойчивости мембран (отношение МДА к степени гемолиза) составляет $0,86 \pm 0,16$ [1].

Известно, что в фетальной крови в норме молодых клеток ретикулоцитов содержится от 3 до 7% [20], а в крови взрослого человека только $0,8\%$ [9], с чем, вероятнее всего, и связана повышенная

erythrocytes hemolysis and 17.8% for fetal erythrocyte hemolysis).

As the literature data testify, the fetal erythrocytes and those of adult donors manifest a different resistance both to hypotonic NaCl solutions (osmotic resistance) and to acid hemolytics (acid resistance). The range of osmotic resistance for donor's erythrocytes in the norm makes $12-20$, for fetal ones $18-28$ [19]. The acid erythrograms for fetal blood are more extended within time range as well [16]. The population of fetal erythrocytes is not uniform by cell resistance: there is a quite big number of middle-resistant cells ($48.4 \pm 0.52\%$), cells with an increased resistance ($41.6 \pm 0.41\%$) and highly resistant ($2.5 \pm 0.12\%$). The similar redistribution for donor's erythrocytes is the following: $58.3 \pm 1.04\%$ of middle-resistant, $22.2 \pm 0.47\%$ with an increased resistance [2]. Thus, the number of highly resistant cells in fetal blood is 6 times higher, than in donor blood.

The analysis of fetal blood morphoerythrograms testifies to its polymorphism and a manifested anisocytosis. The presence of normocytes, macrocytes, reticulocytes is characteristic for fetal blood, there are met the nucleus-containing forms, normoblasts, macroblasts [3, 19]. The distribution of fetal erythrocytes by the sphericity index has a polymodal character and represents the sum of distributions of several populations. There is the maximum for cells with 1.37 ± 0.075 sphericity index, which is the closest to the maximum in curves for adult donors ($1.38-1.58$ for normocytes). The number of condensed cells with the sphericity index within the range of $1.6-2.3$ makes about 14% , that is considerably higher, than for adult donors (about 8%) [5]. To such condensed forms one refers first of all the young erythrocytes: reticulocytes or “macropanocytes”, for which the ratio of diameter to thickness makes 4.1 , meanwhile for normocytes this index is equal to 3.6 [12]. The high osmotic resistance is observed namely during an increase in the ratio of erythrocyte membrane area to its volume [10]. The more flattened is erythrocyte, i.e. the more manifested is its macroplania, the bigger is the stock for its swelling in hypotonic medium and more lately its hemolysis occurs.

When dividing the population of donor's erythrocytes by the density in the ficoll gradient with the following incubation of each layer with sublytic doses of lysophosphatides it was demonstrated, that namely young cells occurred to be the most resistant ones [23]. Structural and functional state of young erythrocyte membranes is characterised by a quite high resistance. Thus, the level of malone dialdehyde (MDA), reflecting the lipid peroxidation activity in fetal erythrocyte membranes, makes 2.53 ± 0.21 nM per 10^6 erythrocyte, 173.0 ± 31.6 μ g per 10^6 erythrocyte for total lipids, 7.69 ± 0.41 μ g per 10^6 erythrocyte for total phosphorus, 11.59 ± 1.81 mM per 10^6 erythrocyte for hydrogen

устойчивость фетальных эритроцитов к гипертоническому воздействию.

При анализе состояния поверхности донорских эритроцитов человека в условиях умеренной гипертонии нами установлено, что изменение рельефа клеточной мембраны при обезвоживании сопровождается частичной деструкцией внешних примембранных слоев. Повреждение гликокаликса, связанного с липидным бислоем клеточной мембраны, в дальнейшем может явиться одной из возможных причин развития гипертонического гемолиза [15]. Согласно теории минимального объема [21,22], повреждение эритроцитов при гипертоническом шоке наступает в результате чрезмерного сжатия клеток при обезвоживании и достижении ими некоторого критического объема. Для донорских эритроцитов критический объем составляет 55% от исходного, при этом теряется около 65% внутриклеточной воды. Вполне естественно, что в связи с выраженным анизоцитозом фетальных эритроцитов (объем клеток колеблется от 80 до 120 мкм³ [10,20]) критический минимальный объем в популяции клеток достигается не одновременно и, следовательно, гипертонический гемолиз будет развиваться во времени. По мере повышения уровня внеклеточной гипертонии в процесс гемолиза последовательно вовлекаются субпопуляции, имеющие исходно различную устойчивость клеток, в связи с чем изменяется скорость накопления свободного гемоглобина.

Выводы

Таким образом, повышенная длительная (60 мин) устойчивость фетальных эритроцитов к гиперосмотическому воздействию до 2,3 М NaCl (4250 мОсм/л), вполне вероятно, может быть обусловлена наличием в фетальной крови значительного количества молодых эритроцитарных форм. Установленная особенность фетальных эритроцитов по сравнению с донорскими может существенно отразиться на их устойчивости к гипертоническому криогемолизу на его второй стадии – охлаждении.

Литература

1. *Авратинский О.И.* Структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов у здоровых новорожденных в первые дни жизни // *Акушерство и гинекология.* – 1986. – № 3. – С. 33-34.
2. *Вартанян М.М.* Особенности красной крови матери и новорожденного при гипотрофии плода // *Акушерство и гинекология.* – 1986. – N 3. – С. 37-38.
3. *Гематология детского возраста с атласом миелограмм /* Под ред. Б.Я. Резника. – Киев: Здоров'я, 1974. – 390 с.
4. *Голованов М.В.* Способ определения гипертонической устойчивости эритроцитов // *Гематол. и трансфузиол.* – 1991. – N 7. – С. 39-40.

peroxide. The coefficient for membrane resistance (MDA ratio to hemolysis degree) makes 0.86 ± 0.16 [1].

It is known, normally the fetal blood contains from 3 to 7 young cells of reticulocytes [20], but in blood of adult there are only 0.8% [9], to which, an increased erythrocyte resistance to hypertonic effect is most probably related.

When analysing the surface state of human donor's erythrocytes under conditions of moderate hypertension we established, that the change in cell membrane relief during dehydration was accompanied by a partial destruction of external adjacent membrane layers. The damage of glycocalyx, related to the lipid bilayer of cell membrane, can be further one of the possible causes of the hypertonic hemolysis development [15]. According to the theory of minimum volume [21, 22] the erythrocyte damage during hypertonic stress occurs as a result of the excessive compression of cells during dehydration and achieving by them some critical volume. For donor's erythrocytes the critical volume makes 55% from the initial one, at the same time about 65% of intracellular water are lost. It is quite natural that relating to the manifested anisocytosis of fetal erythrocytes (cell volume varies from 80 to 120 μm^3 [10, 20]) the critical minimum volume in cell population is not achieved abruptly, and consequently, hypertonic hemolysis will develop in time. With the augmentation of the level of extracellular hypertension during hemolysis there is a gradual involvement of subpopulations, which initially have different cell resistance, due to that there is a change in the free hemoglobin accumulation rate.

Conclusions

Thus, an increased long-term (60 min) resistance of fetal erythrocytes to hyperosmotic effect up to 2.3 M NaCl (4250 mOsm/l) can be quite probably stipulated by the presence in fetal blood of a considerable number of young erythrocyte forms. The established peculiarity of fetal erythrocytes in comparison with the donor's ones can considerably affect their resistance to hypertonic cryohemolysis at its second stage: cooling.

References

1. *Avratinsky O.I.* Structural and functional state of erythrocyte membranes in healthy newborn children in the first days of life//*Akusherstvo i ginekologiya.* – 1986. – N3. – P.33-34.
2. *Vartanyan M.M.* The peculiarities of red blood in mother and newborn child at fetus hypotrophy//*Akusherstvo i ginekologiya.* – 1986. – N3. – P. 37-38.
3. *Hematology of a child age with the myelogram atlas /* Edited by B.Ya. Reznik. – Kiev: Zdorov'ya, 1974. – 390 p.
4. *Golovanov M.V.* The way for determination of the erythrocyte hypertonic resistance//*Gematologiya i transfuziologiya.* – 1991. – N7. – P. 39-40.

5. *Гордієнко О.І., Гордієнко Є.О., Алексєєва Л.І., Коваленко І.Ф.* Оцінка стану популяції еритроцитів людини по їх розподілу за індексом сферичності // Доповіді НАН України.– 2002.– № 10.– С. 172-177.
6. *Гордієнко Е.А., Коваленко С.Е.* Биophysical model of hypertonic cryohemolysis phenomenon // Пробл. криобиологии.– 1996.– N4.– С.24-31.
7. *Грищенко В.И., Прокопюк О.С., Шраго М.И. и др.* Заготовка и криоконсервирование эритроцитов плацентарной крови для трансфузий // Криобиология.– 1989.– № 2.– С. 31-33.
8. *Дьяконов В.П.* Справочник по алгоритмам и программам на языке Бейсик для персональных ЭВМ.– М.: Наука, 1987.– 254 с.
9. *Кассирский И.А., Алексеев Г.А.* Клиническая гематология.– М.: Медицина, 1970.– 780 с.
10. *Клиническая гематология* / Под ред. Шт.Берчану.– Бухарест: Мед. изд-во, 1985.– 1221 с.
11. *Коваленко С.Є.* Причина та механізм явища гіпертонічного криогемолізу: Автореф. дис... канд. біол. наук. – Харків, 1999.– 18 с.
12. *Крымский Л.Д., Нестайло Г.В., Рыбалов А.Г.* Растровая электронная микроскопия сосудов и крови.– М.: Медицина, 1976.– 168 с.
13. *Кулешова Л.Г., Розанов Л.Ф.* Изучение кинетики взаимодействия эритроцитов человека с криопротекторами и солями // Криобиология и криомедицина.– 1980.– Вып. 7.– С. 40-44.
14. *Кулешова Л.Г., Орлова Н.В., Шпакова Н.М.* Антигемолитическая и трансформирующая активность амфифильных соединений // Пробл. криобиологии.– 2001.– № 1.– С. 8-14.
15. *Кулешова Л.Г.* Оценка состояния поверхности эритроцитов человека в гипертонической среде электролита. 1. Морфологический аспект // Вісник ХДУ. Біофіз. вісник.– 2002.– № 2.– С. 54-56.
16. *Леонова В.Г.* Анализ эритроцитарных популяций в онтогенезе человека.– Новосибирск: Наука, 1987.– 242 с.
17. *Прокопюк О.С.* Лечение постгеморрагических анемий в акушерско-гинекологической практике с использованием криоконсервированных эритроцитов плацентарной крови.: Дис. ... канд. мед.наук.– Харьков, 1989.– 161 с.
18. *Справочник по переливанию крови и кровезаменителей* / Под ред. О.К Гаврилова.– М.: Медицина, 1982.– 303 с.
19. *Тодоров Й.* Клинические лабораторные исследования в педиатрии.– София: Медицина и физкультура, 1961.– 783 с.
20. *Торубарова Н.А., Кошель И.В., Яцык Г.В.* Кроветворение плода и новорожденного.– М: Медицина, 1993.– 207 с.
21. *Meryman H.T.* Osmotic stress as a mechanism of freezing injury // Cryobiology.– 1971.– N 8.– P. 489-500.
22. *Meryman H.T.* Freezing injury and its prevention in living cells// Ann.Rev. Biophys. and Bioeng.– 1974.– Vol. 3, N 4.– P. 341-363.
23. *Rachman J.E., Wright B.J., Cerny E.A.* Studies on the mechanism of erythrocyte aging and destruction // Mechanisms of aging and development.– 1973.– Vol. 2, N 2.– P. 151-162.
24. *Takahashi T., Williams R.J.* Thermal shock hemolysis in human red cells. 1. The effects of temperature, time and osmotic stress // Cryobiology.– 1983.– Vol. 16, N 20.– P. 507-520.
5. *Gordienko O.I., Gordienko E.A., Alekseyeva L.I., Kovalenko I.F.* Estimation of the state of human erythrocyte population on their distribution by the sphericity index // Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine.– 2002.– N10.– P. 172-177.
6. *Gordienko E.A., Kovalenko S.E.* Biophysical model of hypertonic cryohemolysis phenomenon // Problems of Cryobiology.– 1996.– N4.– P. 24-31.
7. *Grischenko V.I., Prokopyuk O.S., Shrago M.I. et al.* Procurement and cryopreservation of placental blood erythrocytes for transfusions // Kriobiologiya.– 1989.– N2.– P. 31-33.
8. *Diakonov V.P.* Reference book on algorithms and programs in Basic language for personal computers.– Moscow: Nauka, 1987.– 254 p.
9. *Kassirsky I.A., Alekseyev G.A.* Clinical hematology.– Moscow: Meditsina, 1970.– 780 p.
10. *Clinical hematology*/ Edited by Sht. Berchanu.– Bucharest: Meditsinskoe izdatel'stvo, 1985.– 1221 p.
11. *Kovalenko S.E.* Cause and mechanism of hypertonic cryohemolysis phenomenon: Author's abstract of the thesis of candidate of biological sciences.– Kharkov, 1999.– 18 p.
12. *Krymskiy L.D., Nestailo G.V., Rybalov A.G.* Raster electron microscopy of vessels and blood.– Moscow: Meditsina, 1976.– 168 p.
13. *Kuleshova L.G., Rozanov L.F.* Study of kinetics of human erythrocyte interaction with cryoprotectants and salts// Kriobiologiya i kriomeditsina.– 1980.– Issue 7.– P. 40-44.
14. *Kuleshova L.G., Orlova N.V., Shpakova N.M.* Antihemolytic and transforming activity of amphiphilic compounds// Problems of Cryobiology.– 2001.– N1.– P. 8-14.
15. *Kuleshova L.G.* Estimation of surface state of human erythrocytes in hypertonic medium of electrolyte. 1. Morphological aspect//Visnyk Kharkivs'kogo Derzhavnogo Universytetu. Biofizychnyy visnyk.– 2002.– N2.– P. 54-56.
16. *Leonova V.G.* Analysis of erythrocyte populations in human ontogenesis.– Novosibirsk: Nauka, 1987.– 242 p.
17. *Prokopyuk O.S.* Treatment of post-hemorrhagic anemias in obstetrical and gynecological practice with usage of cryopreserved erythrocytes of placental blood: Thesis of candidate of medical sciences.– Kharkov, 1989.– 161 p.
18. *Reference book on blood transfusion and blood substitutes*/ Edited by O.K. Gavrillov.– Moscow: Meditsina, 1982.– 303 p.
19. *Todorov J.* Clinical laboratory investigations in pediatrics.– Sofia: Meditsina i fizkultura, 1961.– 783 p.
20. *Torubarova N.A., Koshel I.V., Yatsyk G.V.* Hemopoiesis of fetus and a newborn child.– Moscow: Meditsina, 1993.– 207 p.
21. *Meryman H.T.* Osmotic stress as a mechanism of freezing injury // Cryobiology.– 1971.– N8.– P. 489-500.
22. *Meryman H.T.* Freezing injury and its prevention in living cells // Ann. Rev. Biophys. and Bioeng.– 1974.– Vol.3, N4.– P. 341-363.
23. *Rachman J.E., Wright B.J., Cerny E.A.* Studies on the mechanism of erythrocyte aging and destruction // Mechanisms of aging and development.– 1973.– Vol.2, N2.– P. 151-162.
24. *Takahashi T., Williams R.J.* Thermal shock hemolysis in human red cells. 1. The effects of temperature, time and osmotic stress // Cryobiology.– 1983.– Vol.20, N6.– P.507-520.

Accepted in 14.07.2003

Поступила 14.07.2003