

УДК 616-001.18/19:612.111.014.462.1:577.352.462

Г.О. Ковальов*, О.О. Чабаненко, Н.В. Орлова, Н.М. Шпакова

Осмотична резистентність еритроцитів щурів після локальної холодової травми

UDC 616-001.18/19:612.111.014.462.1:577.352.462

G.O. Kovalov*, O.O. Chabanenko, N.V. Orlova, N.M. Shpakova

Osmotic Resistance of Rat's Erythrocytes After Local Cold Injury

Реферат: У роботі досліджували вплив локальної холодової травми щурів на осмотичну резистентність еритроцитів у ранній і пізній реактивні періоди. Кріовплив здійснювали шляхом притиснення аплікатора до шкіри на латеральній поверхні стегна щура протягом 30, 60 і 120 с. Після цього проводили забір крові з аорти тварин через 1 і 4 години і через 24 і 48 годин (ранній і пізній реактивний періоди відповідно). В якості тесту на осмотичну резистентність еритроцитів використовували дію на клітини гіпотонічних розчинів. Показано, що осмотична резистентність еритроцитів у ранньому реактивному періоді збільшується (порівняно з контрольними клітинами). У пізньому реактивному періоді показники осмотичної резистентності еритроцитів через 24 години наближаються до контрольних значень і через 48 годин досягають норми. Осмотична резистентність еритроцитів в обох реактивних періодах після локальної холодової травми не залежить від тривалості кріоаплікації (30, 60, 120 с). Отримані результати розглядаються з позицій адаптивних реакцій, що мають алостазну природу.

Ключові слова: локальна холодова травма, еритроцити, осмотична резистентність, гіпотонічний шок, реактивний період.

Abstract: The effect of local cold injury in rats on the osmotic resistance of erythrocytes in the early and late reactive terms was investigated. Cryoinfluence was performed by pressing the applicator to the skin on the lateral surface of the rat thigh for 30, 60 and 120 s. Afterwards, the blood was collected from the aorta of animals after 1 and 4 hours and after 24 and 48 hours (early and late reactive periods, respectively). The effect of hypotonic solutions on cells was used as a test for osmotic resistance of erythrocytes. It is shown that the osmotic resistance of erythrocytes in the early reactive term increases (compared with control cells). In the late reactive term, the indices of osmotic resistance of erythrocytes after 24 hours approached the control values and after 48 hours they reached the norm. Osmotic resistance of erythrocytes in both reactive terms after local cold injury does not depend on the duration of cryoinfluence (30, 60, 120 s). The findings are considered from the standpoint of adaptive reactions that have an allostatic nature.

Key words: local cold injury, erythrocytes, osmotic resistance, hypotonic shock, reactive term.

На даний час для лікування патологічних процесів, що розвиваються на шкірі, використовують хірургічний підхід, який полягає у руйнуванні біологічних тканин за допомогою низьких температур. Вплив низьких температур супроводжується заморожуванням не тільки шкіри, але і глибше розташованих тканин. Тривалість кріовпливу і кінцева температура заморожених тканин мають вирішальне значення для результатів лікування [7, 9].

Локальна холодова травма (ЛХТ) є потужним стресовим фактором, що запускає процеси алостазу на рівні організму. Алостаз розглядається як динамічний процес, за допомогою якого організм відповідає на стресові впливи і підтримує гомеостаз [3]. Однією з ознак алостазу є надактивація регуляторних систем [19]. До біологічних систем, які забезпечують адаптацію організму, в першу чергу, належать гіпоталамогіпофізарно-надниркова вісь, вегетативна

Currently, for the treatment of pathological processes developing on skin, exploits a surgical approach, which consists in the destruction of biological tissues by low temperatures. Exposure to low temperatures is accompanied by freezing not only of the skin but also of deeper tissues. The duration of cryopreservation and final temperature of frozen tissues are crucial for treatment outcomes [1, 3].

Local cold injury (LCI) is a powerful stressor that triggers allostasis at the organism level. Allostasis is considered as a dynamic process by which the body responds to a stress and maintains homeostasis [12]. One of the signs of allostasis is overactivation of regulatory systems [16]. The biological systems that ensure the organism adaptation, in the first place, include the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, autonomic nervous, metabolic and immune systems. The main mediators of these systems (neurotransmitters of the sympathetic and parasympathetic nervous systems, cytokines, metabolic

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

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

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: kovalyovhome@ukr.net

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: kovalyovhome@ukr.net

Надійшла 14.06.2021

Прийнята до друку 14.12.2021

Received 14, June, 2021

Accepted 14, December, 2021

© 2022 G.O. Kovalov, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

нервова система, метаболічна та імунна системи. Головні медіатори цих систем (нейротрансмітери симпатичної і парасимпатичної нервової системи, цитокіни, метаболічні гормони, нейромодулятори мозку, гормони надниркових залоз) взаємодіють один з одним і сприяють адаптації організму до екстремальних умов в найкоротші терміни [3, 18].

Гостра патологія внаслідок локального кріоефекту впливає на усі ланки регуляції: від загальних керівних систем до клітин. Зокрема, в роботі Г.А. Олійник [5] під час дослідження перебігу ЛХТ щурів було виявлено ехіноцити, стоматоцити, шизоцити і зареєстровано уповільнення рухливості клітин, що, на думку авторів, може свідчити про порушення енергозабезпечення організму, яке пов'язане з нестачею АТФ.

За умов холодової травми спостерігаються зміни морфологічних характеристик еритроцитів [5], що свідчить про зміну осмотичної резистентності цих клітин. Для визначення осмотичної резистентності еритроцитів широко використовують гіпотонічні розчини [21, 23, 25]. Перенесення еритроцитів до гіпотонічних середовищ супроводжується надходженням води в клітини, в результаті чого збільшується їхній об'єм і за перевищення значень критичного гемолітичного об'єму, вони руйнуються [14]. Осмотична резистентність, яка характеризується здатністю еритроцитів приймати воду без гемолізу, залежить, зокрема, від співвідношення площі поверхні до об'єму клітини [14].

Оцінка осмотичної резистентності еритроцитів — класичний тест, який застосовується під час діагностики еритроцитопатій (зокрема, спадкового сфероцитозу, коли в результаті патології білків цитоскелет-мембранного комплексу еритроцити стають менш стійкими до дії гіпотонічних розчинів [10]). Осмотична резистентність еритроцитів є важливим клінічним інструментом для вивчення таких численних захворювань, як цукровий діабет [22], преєклампсія [12] та малярія [17], а також під час дослідження процесу старіння [11, 20] тощо. Вивчення осмотичної резистентності еритроцитів в умовах ЛХТ дозволить виявити реакцію клітин, відповідальних, в першу чергу, за газообмін, на зміни в організмі внаслідок критичних і посттравматичних станів.

Мета роботи — вивчення впливу локальної холодової травми у щурів на осмотичну резистентність еритроцитів протягом раннього та пізнього реактивних періодів.

hormones, brain neuromodulators, adrenal hormones) interact with each other and help the body in adaptation to extreme conditions in the shortest possible time [12, 18].

Acute pathology resulted from the local cryoeffect influences all parts of regulation, from general control systems to cells. In particular, in the work of G.A. Oliynyk [18] when studying the LCI proceeding in rats there were detected echinocytes, stomatocytes, schizocytes and a slowdown in cell motility was found, which, as the authors believe may indicate a disorder in energy supply due to ATP deficiency.

During cold injury, the alterations in the morphological characteristics of erythrocytes are observed [18], indicating a change in the osmotic resistance of these cells. To determine the osmotic resistance of erythrocytes, the effect of hypotonic solutions on them is widely used [21, 23, 25]. The transfer of erythrocytes to hypotonic media is accompanied by the water inflow into the cells, as a result of which their volume increases and when the values of the critical hemolytic volume are exceeded, they are destroyed [9]. Osmotic resistance, which is characterized by the ability of erythrocytes to get water without hemolysis, depends, in particular, on the ratio of surface area to cell volume [9].

Assessment of osmotic resistance of erythrocytes is a classic test used in the diagnosis of erythrocytopathy (including hereditary spherocytosis, when erythrocytes become less resistant to hypotonic solutions as a result of cytoskeletal membrane protein pathology) [4]. Erythrocyte osmotic resistance is an important clinical tool when investigating the numerous diseases such as diabetes [22], preeclampsia [5] and malaria [14], as well as in aging research [6, 20], *etc.* The study of osmotic resistance of erythrocytes in LCI will reveal the response of cells primarily responsible for gas exchange, to changes in the body during critical and post-traumatic states.

The research aim was to study the effect of local cold injury in rats on the osmotic resistance of erythrocytes in the early and late reactive terms.

Materials and methods

The study was performed in 6-month-old outbred male rats. The experiments were approved by the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine and agreed with the main provisions of the Law of Ukraine 'On Protection of Animals Against Cruelty' (№ 3447-IV of February 21, 2006) and the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

Матеріали та методи

Дослідження виконували на 6-місячних безпородних щурах-самцях. Експерименти дозволені комітетом з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України та узгоджені з основними положеннями Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) та «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Тварини були розділені на 4 групи ($n = 10$ у кожній), з яких 3 експериментальні (проводили ЛХТ) і контрольна (без ЛХТ) групи. Розподіл тварин за експериментальними групами залежав від тривалості кріовпливу, який здійснювали притисненням аплікатора до шкіри на латеральній поверхні стегна щура протягом 30, 60 і 120 с.

Після кріовпливу здійснювали забір крові з аорти тварин через 1 і 4 годин (ранній реактивний період), а також через 24 і 48 годин (пізній реактивний період). У якості антикоагулянту використовували гепарин (500 од/мл). Для анестезії тварин застосовували препарат «Телазол» (Zoetis Inc, США) в дозі 50 мг/кг внутрішньом'язово. У роботі використовували виготовлений у СКТБ ІПКіК НАН України кріоінструмент наливного типу з плоским мідним аплікатором діаметром 8,0 мм, який активно охолоджується рідким азотом.

Еритроцити отримували шляхом триразового центрифугування цільної крові при 1000g протягом 3 хв в 10-кратному об'ємі фізіологічного розчину (0,15 моль/л NaCl, 5 ммоль/л фосфатного буфера, pH 7,4). Лейкоцитарну плівку і супернатант видаляли шляхом аспірації.

Осмотичну резистентність (ОР) еритроцитів визначали за стійкістю клітин до гіпотонічних розчинів NaCl. Гіпотонічний лізис еритроцитів здійснювали шляхом перенесення клітинної суспензії в гіпотонічні середовища (40–100 ммоль/л NaCl) на 5 хв за температури 37°C з наступним центрифугуванням при 1000g протягом 3 хв. Рівень гемолізу еритроцитів визначали спектрофотометрично на довжині хвилі 543 нм. За 100% брали поглинання проби, до якої додавали детергент тритон X-100 у концентрації 0,1%. Усі використані в роботі середовища готували на 5 ммоль/л фосфатному буфері, pH 7,4.

Кут нахилу кривої осмотичної крихкості в ділянці різкого збільшення гемолізу розраховували за методикою, представленою в роботі T. Walski та співавт. [25].

Animals were divided into 4 groups ($n = 10$ in each), of which 3 experimental (with LCI performed) and control (without LCI) groups. The distribution of animals in the experimental groups depended on the duration of cryopreservation, which was carried out by pressing the applicator to the skin on the lateral surface of rat's thigh for 30, 60 and 120 s.

After cryoeffect the blood was collected from the aorta of animals after 1 and 4 hours (early reactive term), as well as after 24 and 48 hours (late reactive term). Heparin (500 IU/ml) was used as an anticoagulant. Telazol (Zoetis Inc, USA) was administered to anesthetized animals at a dose of 50 mg/kg intramuscularly. The cryo-instrument of the liquid bulk type with a flat copper applicator of 8.0 mm diameter, which is actively cooled by liquid nitrogen, manufactured at the Special Construction and Designing Unit of the IPCC NAS of Ukraine, was used in this research.

Erythrocytes were obtained by centrifuging the whole blood thrice at 1,000g for 3 min in 10-fold volume of saline (0.15 mol/L NaCl, 5 mmol/L phosphate buffer, pH 7.4). The leukocyte film and supernatant were removed by aspiration.

Osmotic resistance (OR) of erythrocytes was examined by the one of cells to hypotonic NaCl solutions. Hypotonic lysis of erythrocytes was performed by transferring the cell suspension to hypotonic media (40–100 mmol/L NaCl) for 5 min at 37°C, followed by centrifugation at 1,000g for 3 min. The level of hemolysis of erythrocytes was determined spectrophotometrically at a wavelength of 543 nm. The absorption of the sample was assumed as 100%, to which detergent Triton X-100 was added at a concentration of 0.1%. All media used in the work were prepared with 5 mmol/L phosphate buffer, pH 7.4.

The slope of the osmotic fragility curve in the area of a sharp increase of hemolysis was calculated according to the method presented by T. Walski *et al.* [25].

The obtained experimental results were statistically processed with the Statistica 10.0 software (StatSoft Inc., USA) using the non-parametric Kruskal-Wallis test. The differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

Rats were exposed to LCI for 30 s, after that the blood was taken at different time intervals (in the early and late reactive terms), erythrocytes were obtained and their OR was determined under hypotonic shock.

Fig. 1 shows that the dependence of hypotonic hemolysis of the control erythrocytes on the salt



Статистичну обробку отриманих експериментальних результатів проводили за допомогою програми «Statistica 10.0» (StatSoft Inc., США) з використанням непараметричного критерію Крассела-Волліса. Відмінності вважали значущими при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Щурів піддавали дії ЛХТ протягом 30 с, після чого здійснювали забір крові через різні часові інтервали (в ранньому та пізньому реактивних періодах), одержували еритроцити і визначали їх ОР за умов гіпотонічного шоку.

З рис. 1 видно, що залежність гіпотонічного гемолізу контрольних еритроцитів від концентрації солі в середовищі має сигмоїдальний вигляд, що узгоджується з результатами, отриманими раніше [8, 25]. В інтервалі концентрацій NaCl 80–100 ммоль/л гемоліз контрольних клітин був практично відсутній (до 10%). Початок розвитку гіпотонічного гемолізу цих клітин спостерігався в середовищах із концентрацією NaCl нижче за 80 ммоль/л і збільшувався поки знижувалися значення молярності гіпотонічних розчинів. Більшість еритроцитів після додавання солі в діапазоні концентрацій 50–80 ммоль/л пошкоджувалася, а 100% загибель еритроцитів спостерігалася в середовищі, що містило 40 ммоль/л NaCl.

Під час перенесення в гіпотонічні розчини еритроцитів з крові щурів, підданих дії ЛХТ, характер концентраційної залежності був схожий з контрольною групою, але мав деякі особливості. Концентраційні залежності гемолізу еритроцитів у ранній реактивний період після ЛХТ (рис. 1) зміщувався в бік менших значень концентрацій NaCl порівняно з контролем, при цьому тангенс кута нахилу цих залежностей не відрізнявся від контрольного значення ($\text{tg } \alpha = 1,657$). У разі забору крові через годину після ЛХТ значущі відмінності рівня гіпотонічного гемолізу еритроцитів спостерігалися майже в усьому концентраційному діапазоні солі порівняно з контролем, а через 4 години — тільки в середовищах, що містять 60–80 ммоль/л NaCl.

Отримані в пізньому реактивному періоді після ЛХТ дані представлено на рис. 2. Видно, що через 24 години рівень гемолізу еритроцитів не відрізнявся від контрольних значень у середовищах, що містять 40–60 ммоль/л NaCl. При цьому значущі відмінності було виявлено під час використання NaCl у концентраціях 70–80 ммоль/л порівняно з контролем. Про це свідчить значення тангенса кута нахилу цієї залеж-

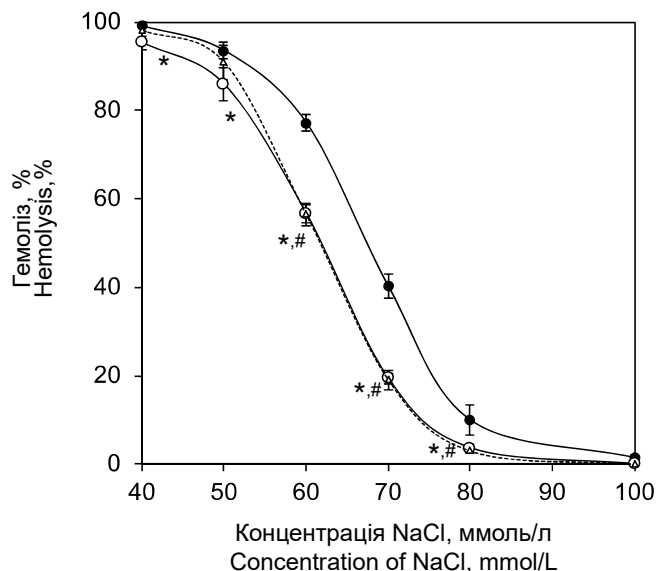


Рис. 1. Рівень гіпотонічного гемолізу еритроцитів крові щурів, забраної у ранньому реактивному періоді після кріоаплікації впродовж 30 с: контроль (●), забір крові через 1 (○) та 4 (Δ) години; *# — відмінності показників клітин, отриманих через 1 та 4 години відповідно, значущі порівняно з контролем ($p < 0,05$).

Fig. 1. Level of hypotonic hemolysis of erythrocytes of rat's blood collected in the early reactive term after cryoapplication for 30 s: control (●), blood collection after 1 (○) and 4 (Δ) hours; *# — significant differences in cell parameters obtained after 1 and 4 hours, respectively, compared with the control ($p < 0.05$).

concentration in the medium has a sigmoidal appearance, that is consistent with the results obtained earlier [2, 25]. Within the range of NaCl concentrations of 80–100 mmol/L hemolysis of the control cells was practically absent (up to 10%). The onset of hypotonic hemolysis of these cells was observed in the media with NaCl concentrations below 80 mmol/L and increased while decreasing the molarity of hypotonic solutions. The bulk of erythrocytes after the addition of salt within the concentration range of 50–80 mmol/L was damaged, and 100% their death was observed in a medium containing 40 mmol/L NaCl.

During the transfer to hypotonic solutions of erythrocytes from the blood of rats exposed to LCI, the nature of the concentration dependence was similar to the control group, but had some features. Concentration dependences of erythrocyte hemolysis in the early reactive term after LCI (Fig. 1) was shifted towards lower values of NaCl concentrations compared to the control, while the tangent of the inclination angle for these dependences did not differ from the control value ($\text{tg } \alpha = 1.657$). In the case of blood sampling one hour after LCI, significant differences in the level of hypotonic hemolysis of erythrocytes were observed in almost



ності ($\text{tg } \alpha = 1,969$), яке перевищує контрольну величину ($\text{tg } \alpha = 1,657$). Слід зазначити, що не виявлено значущих відмінностей між рівнем гіпотонічного гемолізу еритроцитів (виділення яких здійснювали через 48 годин після ЛХТ) і показниками контрольних клітин у всьому концентраційному діапазоні NaCl (рис. 2).

З вищевикладеного можна зробити висновок, що в ранньому реактивному періоді (через 1 і 4 години) після ЛХТ спостерігається підвищення ОР еритроцитів шурів. У той же час ОР еритроцитів у пізньому реактивному періоді або зачіпає вузький концентраційний діапазон (24 години), або не змінюється (48 годин).

Реакція біологічної системи на дію стресового чинника значною мірою залежить від сили і тривалості його впливу [5]. Тому наступний етап роботи пов'язаний з оцінкою ОР еритроцитів під час варіювання тривалості кріовпливу на організм шурів. Для цього тривалість кріовпливу збільшили в 2–4 рази (60 і 120 с). Отримані експериментальні дані представлено в табл. 1 і 2.

У табл. 1 подано значення гіпотонічного гемолізу еритроцитів після ЛХТ (тривалість кріовпливу 60 і 120 с) в ранній реактивний період. Видно, що при заборі крові у шурів через годину після ЛХТ спостерігається значуще зниження рівня гіпотонічного гемолізу еритроцитів у широкому діапазоні концентрацій NaCl (50–80 ммоль/л). Через 4 години після ЛХТ відзначалось незначне звуження концентраційної зони гіпотонічної стійкості клітин. У цьому випадку діапазон становив 60–80 ммоль/л NaCl.

Результати дослідження ОР еритроцитів у пізньому реактивному періоді (тривалість кріовпливу 60 і 120 с) наведено в табл. 2. Видно, що через 24 години спостерігалось різке звуження діапазона концентрацій NaCl, у якому еритроцити проявляють стійкість. Значущі відмінності порівняно з контролем реєструвалися тільки в середовищі, що містить 70 ммоль/л NaCl. У максимально пізньому реактивному періоді (через 48 годин) величини гіпотонічного гемолізу еритроцитів після ЛХТ зіставні з відповідними контрольними значеннями. Ймовірно, нівелювання відмінностей між значеннями показників гіпотонічного гемолізу еритроцитів у контрольній і експериментальних групах у пізньому реактивному періоді відображає зменшення активності регуляторних систем. Під час повернення метаболічних процесів до нормального діапазону активності зменшувалася потреба органів і тканин у кисні і глюкозі, доставлення яких забезпечували еритроцити.

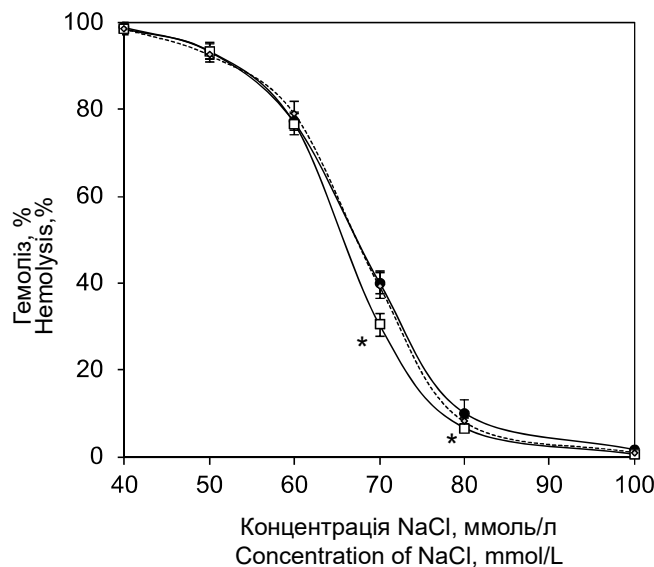


Рис. 2. Рівень гіпотонічного гемолізу еритроцитів крові шурів, забраної в пізньому реактивному періоді після кріоаплікації впродовж 30 с: контроль (●), забір крові через 24 (□) та 48 (◇) годин; * — відмінності показників клітин, отриманих через 24 години, значущі порівняно з контролем ($p < 0,05$).

Fig. 2. Level of hypotonic hemolysis of erythrocytes of rat's blood collected in the late reactive term after cryoapplication for 30 s: control (●), blood collection after 24 (□) and 48 (◇) hours; * — significant differences in cell parameters obtained after 24 hours, compared with the control ($p < 0.05$).

the entire range of salt concentrations compared to control, and after 4 hours this was only in media containing 60–80 mmol/L NaCl.

The data obtained in the late reactive term after LCI are presented in Fig. 2. It demonstrates that after 24 hours the level of hemolysis of erythrocytes did not differ from the control values in the media containing 40–60 mmol/L NaCl. At the same time, strong differences were found when using NaCl at concentrations of 70–80 mmol/L compared to the control. This is evidenced by the value of the tangent of the inclination angle of this dependence ($\text{tg } \alpha = 1.969$), which exceeds the control value ($\text{tg } \alpha = 1.657$). It should be noted that no significant differences were found between the level of hypotonic hemolysis of erythrocytes (which were isolated 48 hours after LCI) and the indices for the control cells in the entire range of NaCl concentrations (Fig. 2).

From the above we can conclude that in the early reactive term (1 and 4 hours) after LCI there is an increase in the OR of rats' erythrocytes. At the same time, the OR of erythrocytes in the late reactive period either affects a narrow concentration range (24 hours) or does not change (48 hours).

The response of biological system to the action of a stress factor largely depends on the strength



Таблиця 1. Рівень гіпотонічного гемолізу еритроцитів крові щурів, забраної в ранньому реактивному періоді (через 1 і 4 години) після кріоаплікації впродовж 60 та 120 с
Table 1. Level of hypotonic hemolysis of erythrocytes of rat blood collected in the early reactive term (1 and 4 hours) after cryoapplication for 60 and 120 s

Концентрація NaCl, ммоль/л Concentration of NaCl, mmol/L	Гемоліз, % Hemolysis, %				
	Контроль Control	1 година 1 hrs		4 години 4 hrs	
		60 с 60 s	120 с 120 s	60 с 60 s	120 с 120 s
40	98,9 ± 0,7	96,4 ± 1,3	97,0 ± 1,2	98,3 ± 2,3	98,3 ± 2,3
50	92,8 ± 1,5	85,8 ± 3,5*	87,1 ± 3,4*	93,7 ± 4,2*	91,3 ± 4,6*
60	76,3 ± 2,3	59,4 ± 4,9*	58,1 ± 1,9*	62,3 ± 3,2*	62,6 ± 5,2*
70	39,2 ± 2,0	19,7 ± 1,3*	17,0 ± 2,1*	19,1 ± 2,2*	17,9 ± 2,2*
80	9,5 ± 2,3	4,5 ± 1,0*	3,4 ± 0,5*	3,1 ± 1,3*	2,4 ± 0,7*
100	1,6 ± 0,5	0,5 ± 0,5	3,4 ± 0,5	0,1 ± 0,3	0,3 ± 0,5

Примітка: * – значущі відмінності порівняно з контролем, $p < 0,05$.

Note: * – differences are significant if compared with the control, $p < 0.05$.

Слід звернути увагу, що реакція еритроцитів експериментальних тварин на зниження концентрації солі в середовищі не залежить від тривалості кріовпливу. Так, порівняльний аналіз величин гіпотонічного гемолізу еритроцитів крові у щурів, які піддавалися дії ЛХТ протягом 30, 60 і 120 с, не виявив значущих відмінностей. Оскільки ОР еритроцитів щурів не залежала від тривалості кріовпливу (в діапазоні від 30 до 120 с), то можна припустити, що складна біологічна система, як-от організм тварини, максимально реагує навіть під час короткочасного (30 с) впливу низьких температур на шкіру і глибше розташовані тканини.

На розвиток термінової адаптації організму під дією стресового чинника впливають декілька взаємопов'язаних механізмів. Запуск цих механізмів здійснюється в результаті активації нервової і ендокринної систем і, як наслідок, значного збільшення в крові стресових гормонів, що активують функцію, а також катаболічні процеси гормонів і нейромедіаторів (адреналін, норадреналін, глюкагон, глюко- і мінералокортикоїди, тиреоїдні гормони тощо) [18]. Ці речовини можуть впливати на еритроцити як безпосередньо, так і опосередковано шляхом запуску каскадних реакцій в організмі.

За допомогою тесту на ОР еритроцитів можна визначити гетерогенність еритроцитарної популяції. Відомо, що мінімальну резистент-

and duration of its impact [18]. Therefore, the next step was to evaluate the erythrocyte OR when varying the duration of cryoinfluence in rats. To do this, the duration of cryopreservation was prolonged by 2–4 times (60 and 120 s). The obtained experimental data are presented in Tables 1 and 2.

Table 1 shows the values of hypotonic hemolysis of erythrocytes after LCI (cryoinfluence duration of 60 and 120 s) in the early reactive term. It is apparent that a significant decrease in the level of hypotonic hemolysis of erythrocytes in a wide range of NaCl concentrations (50–80 mmol/L) is observed during blood sampling in rats one hour after LCI. In 4 hours after LCI, there was a slight narrowing of the concentration zone of hypotonic cell stability. In this case, the range was 60–80 mmol/L NaCl.

The research results of erythrocytes in the late reactive term (60 and 120 s duration of cryoinfluence) are presented in Table 2. It shows that after 24 hours there was a sharp narrowing of the range of NaCl concentrations in which erythrocytes reveal a resistance. Significant differences compared to the control were recorded only in the medium containing 70 mmol/L NaCl. In the most late reactive term (48 hours) the values of hypotonic hemolysis of erythrocytes after LCI are comparable with the corresponding control values. It is likely that the leveling of differences between the values of hypotonic hemolysis of erythrocytes in the control and experimental groups



Таблиця 2. Рівень гіпотонічного гемолізу еритроцитів крові щурів, забраної в пізньому реактивному періоді (через 24 і 48 годин) після кріоаплікації впродовж 60 та 120 с
Table 2. Level of hypotonic hemolysis of erythrocytes of rat blood collected in the late reactive term (24 and 48 hours) after cryoapplication for 60 and 120 s

Концентрація NaCl, ммоль/л Concentration of NaCl, mmol/L	Гемоліз, % Hemolysis, %				
	Контроль Control	24 години 24 hrs		48 годин 48 hrs	
		60 с 60 s	120 с 120 s	60 с 60 s	120 с 120 s
40	98,9 ± 0,7	98,5 ± 1,1	98,4 ± 1,0	98,5 ± 1,2	98,4 ± 1,4
50	92,8 ± 1,5	93,1 ± 2,0	89,5 ± 2,8	95,9 ± 1,8	96,2 ± 1,9
60	76,3 ± 2,3	76,0 ± 3,8	71,6 ± 6,9	78,5 ± 2,8	79,1 ± 3,6
70	39,2 ± 2,0	29,9 ± 1,7*	30,0 ± 1,1*	38,8 ± 3,8	35,1 ± 3,7
80	9,5 ± 2,3	6,6 ± 0,8	6,5 ± 0,7	8,9 ± 1,4	8,9 ± 1,4
100	1,6 ± 0,5	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,1 ± 0,7	1,1 ± 0,9

Примітка: * – значущі відмінності порівняно з контролем, $p < 0,05$.

Note: * – differences are significant if compared with the control, $p < 0.05$.

ність мають старі еритроцити, а максимальну — молоді [16]. Ймовірно, що виявлене в нашій роботі підвищення ОР еритроцитів до гіпотонічних середовищ у ранній реактивний період (через 1 і 4 години) після ЛХТ (див. табл. 1) обумовлене появою стійкої фракції молодих еритроцитів, що надійшли з депо в кровоносне русло [1]. Загасання реакції еритроцитів у пізньому реактивному періоді на зміну тонічності середовища свідчить про те, що збільшення ОР еритроцитів у ранньому реактивному періоді більшою мірою залежить від зміни стану їх мембран, зокрема, під дією гормонів. У роботі Л.Є. Паніна [6] показано, що гормони стресу (адреналін, кортизол, норадреналін) у результаті зв'язування з еритроцитарними мембранами викликають у них структурні переходи. Це призводить до утворення в мембрані еритроцитів щурів складних білок-ліпідних доменів із підвищеною мікров'язкістю.

Збільшення ОР еритроцитів щурів у ранній реактивний період (1 і 4 години) після ЛХТ (див. рис. 1) може бути пов'язане зі зміною морфофункціональних характеристик мембран клітин під дією гормонів. Зокрема, Г.В. Кривоша та співавт. [2] вивчали *in vitro* ОР еритроцитів людини в присутності різних концентрацій адреналіну і виявили його подвійний вплив на клітини: в низьких концентраціях гормон знижує ОР еритроцитів, а в високих — підвищує.

in the late reactive term reflects a decreased activity of regulatory systems. As metabolic processes returned to the normal range of activity, the need of organs and tissues for oxygen and glucose, which were delivered by erythrocytes, decreased.

It should be noted that the response of erythrocytes of experimental animals to the salt concentration reduction in the medium does not depend on the duration of cryoinfluence. Thus, a comparative analysis of the values of hypotonic hemolysis of erythrocytes in the rats exposed to LCI for 30, 60 and 120 s, did not reveal significant differences. Since the rats' erythrocyte OR did not depend on the duration of cryoinfluence (in the range from 30 to 120 s), it can be assumed that a complex biological system, such as an animal, responds maximally even during short (30 s) exposure to low temperatures on the skin and deeper tissues.

The development of the body's immediate adaptation to stress is influenced by several interrelated mechanisms. These mechanisms are triggered by activation of the nervous and endocrine systems and, as a consequence, a significant increase in blood stress-activating hormones, as well as catabolic processes of hormones and neurotransmitters (adrenaline, noradrenaline, glucagon, gluco- and mineralocorticoids, thyroid hormones, *etc.*) [15]. These substances can affect erythrocytes both directly and indirectly by triggering cascading reactions in the body.



На адаптацію й гіперфункцію органів в умовах розвитку алостазу суттєво впливає збільшення вмісту в тканинах і клітинах місцевих «мобілізаторів» функцій: Ca^{2+} , деяких цитокінів, пептидів, нуклеотидів та ін. [18]. Адреналін здатний підсилювати транслокацію аквапоринів 3 [24] і 5 [15], що може обумовлюватися підвищенням внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} [15]. У роботі V.L. Lew та співавт. [16] було показано, що під час навантаження еритроцитів Ca^{2+} (у концентрації 50 мкмоль/л) спостерігається підвищення ОР еритроцитів, що пов'язують зі зміною стану цитоскелет-мембранного комплексу за рахунок активації Ca^{2+} -сигнального шляху.

Механічні властивості мембрани (еластичність та її стабільність) визначаються білок-білковими взаємодіями, в яких бере участь білок смуги 4.1 [4, 21]. На сьогодні проводяться дослідження з виявлення чинників, що регулюють вищезазначені взаємодії, зокрема фосфорилування білка 4.1 мембранними протеїнкіназами [13]. Результати цих досліджень свідчать про те, що фосфорилування білка 4.1 може призводити до релаксації спектринового цитоскелета і формування більш пластичної мембранної структури разом із підвищенням деформованості клітини в цілому [13].

Загалом, наслідки ЛХТ шкіри шурів можна розглядати згідно з теорією алостазу, розвитком змін на різних рівнях організації живої матерії для підтримки гомеостазу в умовах навколишнього середовища, що змінюються. Використання гіпотонічного шоку в якості тесту для визначення стану клітини дозволило виявити підвищення ОР еритроцитів, що свідчить про зміну мембрани еритроцитів в умовах кріовпливу на організм шурів. Ці зміни можна оцінювати як адаптивні реакції, що мають алостазну природу.

Надалі перспективним є вивчення можливості використання показника ОР еритроцитів для оцінки алостатичної відповіді організму на травму, викликану холодом.

Висновки

Таким чином, локальна холодова травма, викликана кріовпливом на шкіру стегна шурів, призводить до зміни осмотичної резистентності еритроцитів. Показано, що осмотична резистентність еритроцитів в ранньому реактивному періоді (через 1 і 4 години після кріовпливу) збільшується порівняно з контрольними клітинами. У пізньому реактивному періоді показники осмотичної резистентності еритроцитів через 24 го-

Erythrocyte OR can be used to determine the heterogeneity of their population. It is known that old erythrocytes have minimal resistance and young cells have maximum one [13]. The increase in erythrocyte OR to hypotonic media in the early reactive term (1 and 4 hours) after LCI (see Table 1) revealed in our work is likely due to the appearance of a stable fraction of young erythrocytes entering the bloodstream from the depot [8]. Attenuation of the response of erythrocytes in the late reactive term to changes in the medium tonicity indicates that the increase in erythrocytes in the early reactive term depends largely on changes in the state of their membranes, in particular under the action of hormones. The research of L.Ye. Panina [19] showed that stress hormones (adrenaline, cortisol, norepinephrine) caused structural transitions in them by binding to erythrocyte membranes. This results in the formation of complex protein-lipid domains with increased microviscosity in the rat erythrocyte membrane.

An increase in rat erythrocyte OR in the early reactive term (1 and 4 hours) after LCI (see Fig. 1) may be associated with changes in the morphofunctional characteristics of hormone cell membranes. In particular, A.V. Krysova *et al.* [11] studied *in vitro* the human erythrocyte OR in the presence of different concentrations of adrenaline and found its double effect on cells: at low concentrations the hormone reduced the OR of erythrocytes, and at high concentrations it increased.

The adaptation and hyperfunction of organs during allostasis development is significantly influenced by the increased content of local 'mobilizers' of functions in tissues and cells: Ca^{2+} , some cytokines, peptides, nucleotides, *etc.* [15]. Adrenaline is able to enhance the translocation of aquaporins 3 [24] and 5 [10], that may be due to increased intracellular concentration of Ca^{2+} ions [10]. The report of V.L. Lew *et al.* [13] demonstrated that during loading of erythrocytes with Ca^{2+} (at a concentration of 50 $\mu\text{mol} / \text{l}$) there was a rise in the OR of erythrocytes, which was associated with altered state of the cytoskeletal membrane complex due to activation of Ca^{2+} signaling pathway.

The mechanical properties of the membrane (elasticity and its stability) are determined by protein-protein interactions in which the band 4.1 protein is involved [17, 21]. To date, the studies are being performed to identify the factors regulating the above interactions, in particular, phosphorylation of protein 4.1 by membrane protein kinases [7]. The results of these investigations suggest that phosphorylation of protein 4.1 may lead to relaxation of the spectral cytoskeleton and formation of a more

дини наближаються до контрольних значень і через 48 годин досягають норми. Зі збільшенням терміну забору крові після локальної холодової травми щурів зростає концентраційний діапазон хлориду натрію, в якому реєструються значущі відмінності величин гіпотонічного гемолізу еритроцитів. Осмотична резистентність еритроцитів в обох реактивних періодах не залежить від тривалості криоаплікації (30, 60, 120 с).

Література

1. Гармаева ДК, Аржакова ЛИ, Дмитриева ТИ, и др. Показатели клеточного состава крови при экспериментальном холодовом воздействии. *Современные проблемы науки и образования*. 2019; (1): 1–8.
2. Крысова АВ, Ноздрачев АД, Куншин АА, Циркин ВИ. Влияние блокаторов альфа и бета-адренорецепторов на способность адреналина изменять осмотическую резистентность эритроцитов небеременных женщин. *Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3. Биология*. 2013; (1): 54–68.
3. Кучук ЕА. От стресса к резилиенсу. *Журнал неврологии им. Б.М. Маньковского*. 2016; 4 (1): 72–7.
4. Муравьев АВ, Тихомирова ИА, Ахапкина АА, и др. Микромеханические ответы эритроцитов человека на стимулирование мембранных рецепторов, ионных каналов и ферментов. *Российский журнал биомеханики*. 2016; 20 (1): 28–36.
5. Олійник ГА. Патолофізіологія холодового шоку. *Медицина невідкладних станів*. 2013; (3): 16–21.
6. Панин ЛЕ, Мокрушников ПВ, Куницын ВГ, и др. Основы многоуровневой мезомеханики наноструктурных переходов в мембранах эритроцитов и их разрушения при взаимодействии с гормонами стресса. *Физическая мезомеханика*. 2011; 14 (1): 5–17.
7. Andrews MD. Cryosurgery for common skin conditions. *Am Fam Physician*. 2004; 69 (10): 2365–72.
8. Arias M, Quijano JS, Haridas V, *et al.* Red blood cell permeabilization by hypotonic treatments, saponin, and anticancer avicins. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1798 (6): 1189–6.
9. Baust JG, Gage AA, Bjerklund JTE, Baust JM. Mechanisms of cryoablation: clinical consequences on malignant tumors. *Cryobiology*. 2014; 68 (1): 1–11.
10. Bolton-Maggs PHB, Langer JC, Iolascon A, *et al.* Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis – 2011 update. *Br J Haematol*. 2011; 156: 37–49.
11. De Freitas MV, Marquez-Bernardes LF, de Arvelos LR, *et al.* Influence of age on the correlations of hematological and biochemical variables with the stability of erythrocyte membrane in relation to sodium dodecyl sulfate. *Hematology*. 2014; 19 (7): 424–30.
12. De Freitas MAR, da Costa AV, Medeiros LA, *et al.* The role of the erythrocyte in the outcome of pregnancy with preeclampsia. *PLoS One* [Internet]. 2019 Mar 6 [cite 13.07.2021]; 14 (3): e0212763. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0212763>
13. Eder PS, Soong CJ, Tao M. Phosphorylation reduces the affinity of protein 4.1 for spectrin. *Biochemistry*. 1986; 25 (7): 1764–70.
14. Gordienko EA, Gordienko YuE, Gordienko OI. The physico-mathematical theory of human erythrocyte hypotonic hemolysis phenomenon. *CryoLetters*. 2003; 24 (4): 229–44.
15. Ishikawa Y, Eguchi T, Skowronski MT, Ishida H. Acetylcholine acts on M3 muscarinic receptors and induces the translocation

plastic membrane structure along with increased deformability of the cell as a whole [7].

In general, the effects of LCI on rat's skin can be considered from the standpoint of the theory of allostasis, the process of development of changes at different levels of living matter organization to maintain homeostasis in changing environments. The use of hypotonic shock to test a cell state revealed an increased OR, that indicated a change in the membrane of erythrocytes under conditions of cryogenic effects on the body of rats. These changes can be assessed as adaptive responses of allostatic nature.

Further promising is the investigation of the possibility of using the OR of erythrocytes to assess the body's allostatic response to cold-caused injury.

Conclusions

Thus, local cold injury caused by cryoinfluence on the skin of rats' thighs led to changes in the osmotic resistance of erythrocytes. It is shown that the osmotic resistance of erythrocytes in the early reactive term (1 and 4 hours after cryoinfluence) increased compared with the control cells. In the late reactive term, the indices of osmotic resistance of erythrocytes after 24 hours approached the control values and after 48 hours reached the norm. Prolonged time of blood collection after local cold injury of rats narrows the concentration range of sodium chloride, by manifesting the strong differences in the values of hypotonic hemolysis of erythrocytes. Osmotic resistance of erythrocytes in both reactive terms does not depend on the duration of cryoinfluence (30, 60, 120 s).

References

1. Andrews MD. Cryosurgery for common skin conditions. *Am Fam Physician*. 2004; 69 (10): 2365–72.
2. Arias M, Quijano JS, Haridas V, *et al.* Red blood cell permeabilization by hypotonic treatments, saponin, and anticancer avicins. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1798 (6): 1189–96.
3. Baust JG, Gage AA, Bjerklund JTE, Baust JM. Mechanisms of cryoablation: clinical consequences on malignant tumors. *Cryobiology*. 2014; 68 (1): 1–11.
4. Bolton-Maggs PHB, Langer JC, Iolascon A, *et al.* Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis – 2011 update. *Br J Haematol*. 2011; 156: 37–49.
5. De Freitas MAR, da Costa AV, Medeiros LA, *et al.* The role of the erythrocyte in the outcome of pregnancy with preeclampsia. *PLoS One* [Internet]. 2019 Mar 6 [cite 13.07.2021]; 14 (3): e0212763. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0212763>
6. De Freitas MV, Marquez-Bernardes L F, de Arvelos LR, *et al.* Influence of age on the correlations of hematological and biochemical variables with the stability of erythrocyte membrane



- of aquaporin 5 water channel via cytosolic Ca^{2+} elevation in rat parotid glands. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 245 (3): 835–40.
16. Lew VL, Daw N, Etzion Z, *et al*. Effects of age-dependent membrane transport changes on the homeostasis of senescent human red blood cells. *Blood*. 2007; 110 (4): 1334–42.
 17. Mascarenhas Netto R de C, Fabbri C, de Freitas MV, *et al*. Influence of *Plasmodium vivax* malaria on the relations between the osmotic stability of human erythrocyte membrane and hematological and biochemical variables. *Parasitol Res*. 2014; 113 (3): 863–74.
 18. McEwen BS. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur J Pharmacol*. 2008; 583 (2–3): 174–85.
 19. McEwen BS, Wingfield JC. What is in a name? Integrating homeostasis, allostasis and stress. *Horm Behav*. 2010; 57 (2): 105–11.
 20. Penha-Silva N, Firmino CB, de Freitas Reis FG, *et al*. Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. *Mech Ageing Dev*. 2007; 128 (7–8): 444–9.
 21. Pretini V, Koenen MH, Kaestner L, Fens MHAM, *et al*. Red blood cells: Chasing interactions. *Front Physiol* [Internet]. 2019; Jul 31. [cite 21.07.2021]. 10: 945. Published 2019 Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2019.00945/full>
 22. Rodrigues R, de Medeiros LA, Cunha LM, *et al*. Correlations of the glycemic variability with oxidative stress and erythrocytes membrane stability in patients with type 1 diabetes under intensive treatment. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018; 144: 153–60.
 23. Semionova EA, Iershova NA, Orlova NV, Shpakova NM. Hypotonic lysis of mammalian erythrocytes in chlorpromazine presence. *Eastern European Scientific Journal*. 2016; (2): 7–17.
 24. Yasui H, Kubota M, Iguchi K, *et al*. Membrane trafficking of aquaporin 3 induced by epinephrine. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 373 (4): 613–7.
 25. Walski T, Chludzinska L, Komorowska M, Witkiewicz W. Individual osmotic fragility distribution: a new parameter for determination of the osmotic properties of human red blood cells. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014 Jan 2 [cite 21.07.2021]. 2014: 162102. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/162102>
- in relation to sodium dodecyl sulfate. *Hematology*. 2014; 19(7): 424–30.
7. Eder PS, Soong CJ, Tao M. Phosphorylation reduces the affinity of protein 4.1 for spectrin. *Biochemistry*. 1986; 25 (7): 1764–70.
 8. Garmaeva DK, Arzhakova LI, Dmitrieva TI, *et al*. [Indicators of cellular composition at experimental cold effects.] *Modern problems of science and education*. 2019; (1): 1–8. Russian.
 9. Gordienko EA, Gordienko YuE, Gordienko OI. The physico-mathematical theory of human erythrocyte hypotonic hemolysis phenomenon. *CryoLetters*. 2003; 24 (4): 229–44.
 10. Ishikawa Y, Eguchi T, Skowronski MT, Ishida H. Acetylcholine acts on M3 muscarinic receptors and induces the translocation of aquaporin 5 water channel via cytosolic Ca^{2+} elevation in rat parotid glands. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 245 (3): 835–40.
 11. Krysova AV, Nozdrachev AD, Kunshin AA, Tsirkin VI. [The effect of alpha- and beta- adrenoblockers on the ability of adrenaline to change the osmotic resistance of erythrocytes of nonpregnant women]. *Vestnik of Saint Petersburg University. Series 3. Biology*. 2013; (1): 54–68. Russian.
 12. Kuchuk EA. [From stress to resilience.] *Zhurnal nevrologii im. B.M. Mankovskoho*. 2016; 4 (1): 72–6. Russian.
 13. Lew VL, Daw N, Etzion Z, *et al*. Effects of age-dependent membrane transport changes on the homeostasis of senescent human red blood cells. *Blood*. 2007; 110 (4): 1334–42.
 14. Mascarenhas Netto R de C, Fabbri C, de Freitas MV, *et al*. Influence of *Plasmodium vivax* malaria on the relations between the osmotic stability of human erythrocyte membrane and hematological and biochemical variables. *Parasitol Res*. 2014; 113(3): 863–74.
 15. McEwen BS. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur J of Pharmacol*. 2008; 583 (2–3): 174–85.
 16. McEwen BS, Wingfield JC. What is in a name? Integrating homeostasis, allostasis and stress. *Horm Behav*. 2010; 57 (2): 105–11.
 17. Muravyov AV, Tikhomirova IA, Akhapkina AA, *et al*. [Micro-mechanical responses of human red blood cells to stimulation of membrane receptors, ionic channels and enzymes.] *Rossiyskiy zhurnal biomekhaniki*. 2016; 20 (1): 23–30. Russian.
 18. Oliynyk GA. [Pathophysiology of cold shock.] *Medytsyna nevidkladnykh staniv*. 2013; (3): 16 – 21. Ukrainian.
 19. Panin LE, Mokrushnikov PV, Kunitsyn VG, *et al*. [Fundamentals of multilevel mesomechanics of nanostructural transitions in erythrocyte membranes and their destructions in interaction with stress hormones.] *Fizicheskaya mezomekhanika*. 2011; 14 (3 – 4): 167–77. Russian.
 20. Penha-Silva N, Firmino CB, de Freitas Reis FG, *et al*. Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. *Mech Ageing Dev*. 2007; 128 (7–8): 444–9.
 21. Pretini V, Koenen MH, Kaestner L, *et al*. Red blood cells: Chasing interactions. *Front Physiol* [Internet]. 2019; Jul 31 [cite 21.07.2021]. 10: 945. Published 2019 Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2019.00945/full>
 22. Rodrigues R, de Medeiros LA, Cunha LM, *et al*. Correlations of the glycemic variability with oxidative stress and erythrocytes membrane stability in patients with type 1 diabetes under intensive treatment. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018; 144: 153–160.
 23. Semionova EA, Iershova NA, Orlova NV, Shpakova NM. Hypotonic lysis of mammalian erythrocytes in chlorpromazine presence. *Eastern European Scientific Journal*. 2016; (2): 7–17.
 24. Yasui H, Kubota M, Iguchi K, *et al*. Membrane trafficking of aquaporin 3 induced by epinephrine. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 373 (4): 613–7.
 25. Walski T, Chludzinska L, Komorowska M, Witkiewicz W. Individual osmotic fragility distribution: a new parameter for determination of the osmotic properties of human red blood cells. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014 Jan 2 [cite 21.07.2021]. 2014: 162102. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/162102>