

## Криогемолиз фетальных эритроцитов человека в гипертонической среде электролита

Л.Г. КУЛЕШОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Cryohemolysis of Human Fetal Erythrocytes in Hypertonic Medium of Electrolyte

L.G. KULESHOVA

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

Методом спектрофотометрии изучен криогемолиз фетальных эритроцитов человека в зависимости от продолжительности экспозиции клеток при комнатной температуре в гипертонических растворах NaCl. Установлено, что эти клетки становятся чувствительными к охлаждению в средах NaCl, осмолярность которых превышает 840 мОсм/л (0,45 М).

**Ключевые слова:** спектрофотометрия, фетальные эритроциты, электролит, гипертония, криогемолиз.

Методом спектрофотометрії вивчено криогемоліз фетальних еритроцитів людини в залежності від тривалості експозиції клітин при кімнатній температурі в гіпертонічних розчинах NaCl. Установлено, що ці клітини стають чутливими до охолодження в середовищах NaCl, осмолярність яких перевищує 840 мОсм/л (0,45 М).

**Ключові слова:** спектрофотометрія, фетальні еритроцити, електроліт, гіпертонія, криогемоліз.

The cryohemolysis of human fetal erythrocytes depending on the duration of cell exposure under room temperature in NaCl hypertonic solutions was studied using spectrophotometry method. These cells were found to become cooling-sensitive in NaCl media, where an osmolarity exceeded 840 mOsm/l (0.45 M).

**Key-words:** spectrophotometry, fetal erythrocytes, electrolyte, hypertension, cryohemolysis.

Установлено [3], что на I стадии гипертонического криогемолиза фетальные эритроциты человека проявляют длительную (60 мин) повышенную (до 2,3 М) гипертоническую устойчивость в электролитной среде NaCl.

Цель данной работы – изучение особенностей II стадии гипертонического криогемолиза фетальных эритроцитов человека, а именно исследование влияния продолжительности экспозиции клеток в гипертонических растворах NaCl при комнатной температуре на их чувствительность к последующему охлаждению.

### Материалы и методы

Исследовали фетальную эритрому, которую получали путем отмывки цельной фетальной крови человека от плазмы, разрушенных клеток и консерванта “Глюгидир” 0,15 М раствором NaCl общепринятым способом [6] и полного удаления надосадка. Гематокрит уплотненной фетальной эритрому контролировали стандартным методом [2]. Его исходная величина составляла 99,0%. Дальнейшие исследования проводили при одинаковом гематокрите, что достигалось разведением уплотненной фетальной эритрому в соотношении 1:10. Исследовали следующий концентрационный ряд водных растворов NaCl:

At the stage I of hypertonic cryohemolysis the human fetal erythrocytes were revealed to manifest a long-term (60 min) increased (up to 2.3M) hypertonic resistance in NaCl electrolyte medium [3].

The aim of this work was to study the stage II peculiarities of hypertonic cryohemolysis in human fetal erythrocytes, namely to investigate the effect of cell exposure duration in NaCl hypertonic solutions under room temperature on their sensitivity to following cooling.

### Materials and methods

There was investigated the fetal erythromass, obtained by washing-out the whole human fetal blood out of plasm, destroyed cells and “Glugicyr” preservative with 0.15 M NaCl solution using a routine technique [6] and a complete supernatant removal. Hematocrit of a compacted fetal erythromass was controlled using the standard method [2]. Its initial value made 99.0%. Following investigations were carried-out with an equal hematocrit, that was achieved by diluting a compacted fetal erythromass in the 1:10 ratio. The following concentration series of NaCl aqueous solutions were investigated: 0.45 M (840 mOsm/l), 0.85 M (1550 mOsm/l), 1.2 M (2300 mOsm/l) and 1.4 M (2600 mOsm/l). Osmotic pressure of solutions was determined with OMKA-C-01 microosmometer.

**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

0,45М (840 мОсм/л), 0,85 М (1550 мОсм/л), 1,2 М (2300 мОсм/л) и 1,4 М (2600 мОсм/л). Осмотическое давление растворов определяли на микроосмометре ОМКА-Ц-01.

В эксперименте 1 мл уплотненной фетальной эритроцитной массы смешивали с 9 мл гипертонических растворов NaCl исследуемых концентраций. После 5-, 10-, 15-минутной изотермической экспозиции образцы помещали в камеру программного замораживателя УОП-6 и охлаждали от температуры 24°C до -1,5°C со скоростью 3°C/мин. Выбор данной температуры был обусловлен тем, что согласно фазовой диаграмме плавления двойной системы NaCl-вода при содержании в растворе 0,45 М NaCl и, следовательно, при более высоких концентрациях электролита в ней не происходит фазовый переход "вода-лед" [5]. При достижении конечной температуры охлаждения образцы отогревали со скоростью 3°C/мин. Поскольку в процессе цикла охлаждения-отогрева эффективное время экспозиции фетальных эритроцитов в гипертонической среде увеличивалось, в контроле клетки экспонировали в исследуемых растворах при комнатной температуре с учетом времени, соответствующего длительности цикла (в среднем 17 мин). После отогрева экспериментальные и контрольные образцы центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин, отбирали супернатант и фотометрировали его в области 410 нм на спектрофотометре СФ-26, помещая в канал сравнения спектрофотометра соответствующие растворы, не содержащие клеток. Концентрацию свободного гемоглобина в супернатантах определяли по градуировочным кривым и выражали в мг% или в процентах по отношению к 100%-му гемолизу. Критерием степени выраженности чувствительности фетальных эритроцитов к охлаждению служил коэффициент К, определяемый по формуле:

$$K = \frac{G_{ox} - G_k}{G_{kp}},$$

где  $G_{ox}$  – уровень свободного гемоглобина в супернатанте после охлаждения-отогрева;  $G_k$  – уровень свободного гемоглобина в супернатантах соответствующих контрольных образцов;  $G_{kp}$  – уровень свободного гемоглобина в супернатанте криоконсервированной крови взрослого донора после отмывки ее от глицерина, допускаемый при трансфузии, равный 200 мг% [6]. Таким образом,  $K=1$  характеризовал критический уровень устойчивости фетальных эритроцитов к охлаждению. Статистическую обработку результатов проводили традиционным методом, определяя стандартное отклонение.

In the experiment 1 ml of compacted fetal erythrocyte mass was mixed with 9 ml of NaCl hypertonic solution of the studied concentrations. After 5-, 10-, 15 min's isothermal exposure the samples were placed into the UOP-6 programmable freezer chamber and cooled from 24°C down to -1.5°C with 3°C/min rate. The choice of this temperature was stipulated by the fact, that according to phase diagram of NaCl-water binary system melting under 0.45 M NaCl content in a solution and, consequently, under higher electrolyte concentrations, no "water-ice" phase transition occurred in it [5]. When reaching a final cooling temperature the samples were thawed with 3°C/min rate. As during a "cooling-thawing" cycle process an efficient time of fetal erythrocyte exposure in hypertonic medium increased, in the control the cells were exposed in the studied solutions under room temperature taking into account the time, corresponding to the cycle duration (it made 17 min in average). After thawing the experimental and control samples were centrifuged for 15 min at 3000 rpm, the supernatant was taken and photometrically estimated within the range of 410 nm with a SP-26 spectrophotometer by placing the corresponding cell-free solutions into a comparison channel of spectrophotometer. Free hemoglobin concentration in a supernatant was examined by graduated curves and shown in mg% or in percentage in respect to 100% hemolysis. As the criterion for manifestation degree of fetal erythrocyte sensitivity to cooling served the coefficient K, determined by the formula:

$$K = \frac{H_{cool} - H_{contr}}{H_{cryo}},$$

where  $H_{cool}$  is the level of free hemoglobin in a supernatant after cooling-thawing;  $H_{contr}$  is the level of free hemoglobin in supernatants of corresponding control samples;  $H_{cryo}$  is the level of free hemoglobin in supernatant of adult donor's cryopreserved blood after its washing-out of glycerol, admissible under transfusion, equal to 200 mg% [6]. Thus,  $K=1$  characterised a critical level of fetal erythrocyte resistance to cooling. Statistical processing of the results was done by means of traditional method with a standard deviation determining.

## Results and discussion

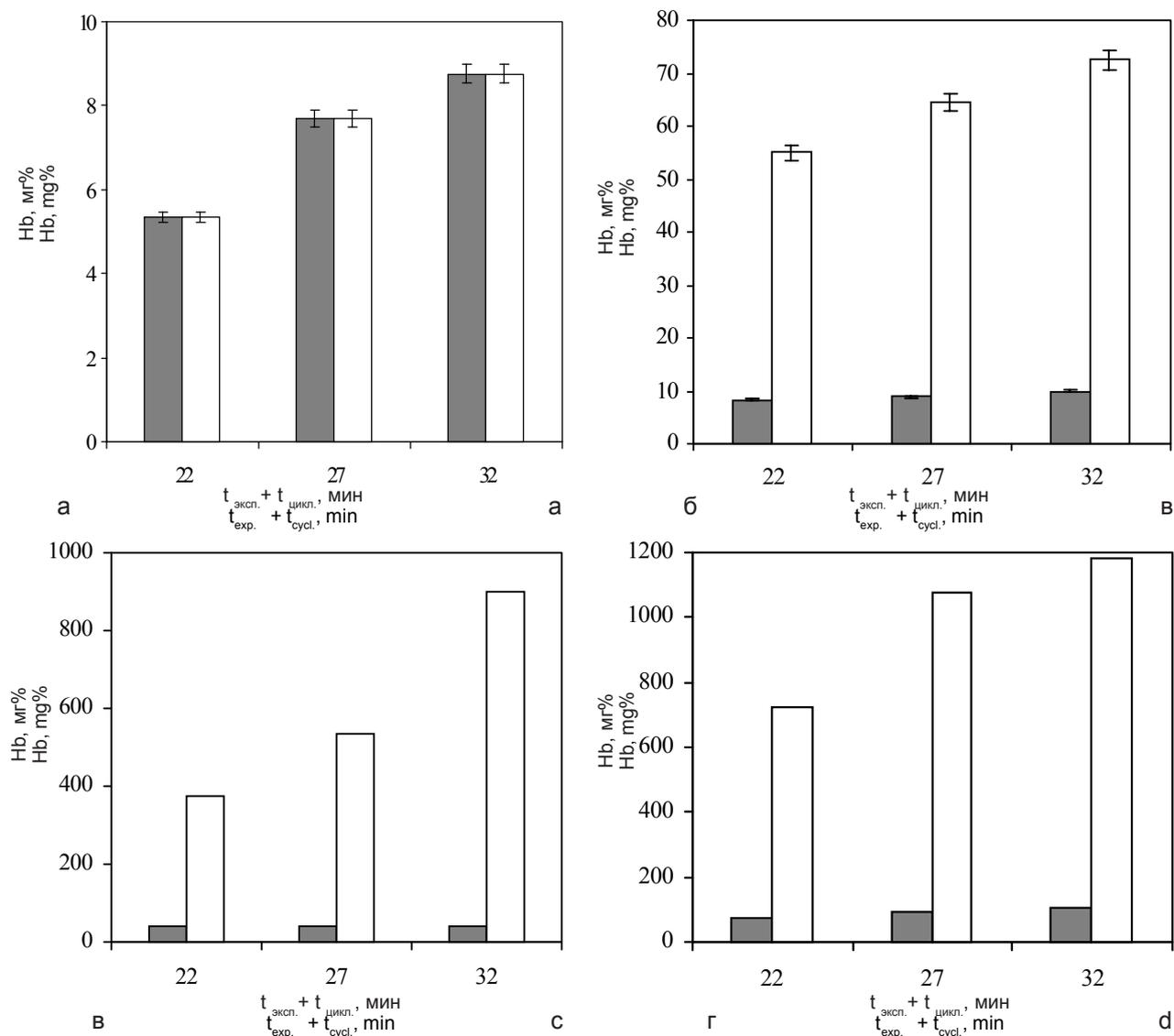
The Fig.1 shows the histograms of cryohemolysis development of human fetal erythrocytes depending on time of cell preincubation in NaCl hypertonic solutions. The Table 1 demonstrates the coefficients of fetal erythrocyte sensitivity to cooling. Independently on the exposure time of fetal erythrocytes in 0.45M of NaCl solution they remain insensitive to following

## Результаты и обсуждение

На рисунке представлены гистограммы развития криогемолиза fetal эритроцитов человека в зависимости от времени предынкубации клеток в гипертонических растворах NaCl. В табл. 1 приведены коэффициенты чувствительности fetal эритроцитов к охлаждению. Независимо от времени экспозиции fetal эритроцитов в 0,45 М растворе NaCl они остаются не чувствительными к последующему охлаждению (рисунок, а). Слабовыраженная чувствительность ( $K < 0,5$ ) fetal эритроцитов к охлаждению начинает проявляться при 5-минутной предынкубации клеток в 0,85 М растворе NaCl (рисунок, б). Далее криогемолиз fetal эритроцитов закономерно возрастает при увеличении как гипертоничности среды, так и времени предын-

cooling (Figure, a). A slightly manifested sensitivity ( $K < 0.5$ ) of fetal erythrocytes to cooling begins to be manifested at a 5-min' cell preincubation in 0.85 M NaCl solution (Figure, b). Further cryohemolysis of fetal erythrocytes regularly augments both with an increase in medium hypertonicity and cell preincubation time in it (Figure c, d). The Table 1 data testify to the fact, that an increased sensitivity to cooling ( $K \geq 1$ ) is gained by fetal erythrocytes within the medium hypertonicity range of 0.85-1.2 M NaCl.

As proceeds from the Table 2, the sensitivity coefficients of human fetal erythrocytes to hypertonic effect of 1.2 M NaCl solution (stage I) are much lower than 1 at all exposure times. Hypertonic cryohemolysis of fetal erythrocytes at their preincubation exceeds the critical level ( $K > 1$ ) even for 5 min in 1.2 M NaCl solution (Table 1) and is comparable with that of cell



**Рис.1.** Криогемолиз fetal эритроцитов человека в зависимости от времени предынкубации клеток в гипертонической среде NaCl: ■ – контроль; □ – опыт. а – 0.45 М; б – 0.85 М; в – 1.2 М; г – 1.4 М.

**Fig.1.** Cryohemolysis of human fetal erythrocytes depending on cell preincubation time in NaCl hypertonic medium: ■ – control; □ – experiment. а – 0.45 М; б – 0.85 М; в – 1.2 М; д – 1.4 М.

кубации клеток в ней (рисунок, в, г). Данные табл. 1 свидетельствуют о том, что повышенную чувствительность к охлаждению ( $K \geq 1$ ) фетальные эритроциты человека приобретают в интервале гипертоничности среды 0,85-1,2 М NaCl.

Как следует из табл. 2, коэффициенты чувствительности фетальных эритроцитов человека к гипертоническому воздействию 1,2 М раствора NaCl (I стадия) намного меньше 1 при всех временах экспозиции. Гипертонический криогемолиз фетальных эритроцитов при их предынкубации уже в течение 5 мин в 1,2 М растворе NaCl (табл. 1) превышает критический ( $K > 1$ ) и сравним с уровнем гипертонического гемолиза клеток при их экспозиции в течение 15 мин в 2,3 М растворе NaCl. Сравнимые данные отмечены в табл. 1 и 2. Таким образом, как и эритроциты взрослых доноров, фетальные эритроциты человека приобретают чувствительность к последующему охлаждению на этапе экспозиции клеток в гипертонических растворах при комнатной температуре.

Изучая особенности гипертонического криогемолиза эритроцитов взрослых доноров, Morris G.J. с соавт. [9] показали, что изотермическая экспозиция клеток в течение 5 мин при 20°C в гипертонических растворах NaCl с осмолярностью до 1350 мОсм/л (0,74 М) индуцирует гемолиз менее 2%. Также установили, что выраженная чувствительность донорских эритроцитов к последующему охлаждению возникает при их экспозиции в растворах NaCl, осмолярность которых превышает 1200-1400 мОсм/л (0,65-0,80 М) [8]. При этом гемолиз эритроцитов в результате охлаждения начинается только после падения температуры суспензии ниже 12°C [11], т.е. в области структурно-фазовых превращений в мембране клеток (8-13°C) [7]. Более высокая скорость охлаждения суспензии приводит к большему гемолизу [11] и смещению порога чувствительности донорских эритроцитов к охлаждению до 950 мОсм/л (0,50 М) среды предынкубации. Предварительная экспозиция донорских эритроцитов в растворах NaCl с осмолярностью ниже 750 мОсм/л (0,36 М) не сенсibiliзирует клетки к последующему охлаждению как до 0°C, так и до -10°C [9].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что для фетальных эритроцитов нижний порог чувствительности к последующему охлаждению находится выше 840 мОсм/л (0,45 М), т.е. превосходит порог чувствительности эритроцитов взрослых доноров. Вполне вероятно, что как повышенная гипертоническая устойчивость, так и повышенная по сравнению с донорскими эритроцитами гипертоническая криоустойчивость фетальных эритроцитов обусловлена повышенным содержанием в фетальной крови молодых эритроцитарных форм [3].

**Таблица 1.** Коэффициенты чувствительности фетальных эритроцитов человека к охлаждению (II стадия гипертонического криогемолиза)

**Table 1.** Sensitivity coefficients of human fetal erythrocytes to cooling (stage II of hypertonic cryohemolysis)

Концентрация NaCl, М NaCl concentration, M	Время предынкубации, мин Preincubation time, min		
	5	10	15
0,45	0,00	0,00	0,00
0,85	0,22	0,28	0,32
1,2	1,67*	2,48	4,31
1,4	3,25	4,85	5,45

**Примечание.** \* – сравниваемые данные.

**Note:** \* – the data under comparing.

hypertonic hemolysis during their exposure for 15 min in 2.3M NaCl solution. The data under comparing are mentioned in the tables 1 and 2. Thus, as well as adult donors' erythrocytes, the human fetal ones acquire the sensitivity to following cooling at the stage of cell exposure in hypertonic solutions under room temperature.

When studying the peculiarities of hypertonic cryohemolysis of adult donors, Morris G.J. with co-authors [9] demonstrated that cell isothermal exposure for 5 min under 20°C in NaCl hypertonic solutions with osmolarity to 1350 mOsm/l (0.74 M) induced hemolysis less than 2%. Manifested sensitivity of donor's erythrocytes to following cooling was also found to appear during their exposure in NaCl solutions, which osmolarity exceeded 1200-1400 mOsm/l (0.65-0.80 M) [8]. At the same time erythrocyte hemolysis as a result of cooling starts only after suspension temperature falling-down lower 12°C [11], i.e. within the area of structural and phase transformations in cell membrane (8-13°C) [7]. Higher cooling rate of suspension results in a greater hemolysis [11] and a shift of sensitivity threshold of donor's erythrocytes to cooling down 950 mOsm/l (0.50 M) of preincubation medium. Preliminary exposure of donor's erythrocytes in NaCl solutions with osmolarity lower than 750 mOsm/l (0.36 M) does not sensitise cells to following cooling both down to 0°C and -10°C [9].

The results obtained testify to the fact, that for fetal erythrocytes the inferior sensitivity threshold to following cooling is higher than 840 mOsm/l (0.45 M), i.e. exceeds the sensitivity threshold for adult donor's erythrocytes. It is quite probable that both increased hypertonic resistance and increased hypertonic cryoresistance of fetal erythrocytes in comparison with donor's ones is stipulated by an increased content of young erythrocyte forms in fetal blood [3].

При оценке состояния поверхности донорских эритроцитов человека в условиях гипертонического воздействия NaCl было показано [4], что в его растворах с концентрацией 0,85 М (1550 мОсм/л) и выше отмечается деструкция внешних примембранных слоев эритроцитов, сопровождающаяся элиминацией во внеклеточную среду гликопротеинов. Именно в этой концентрационной зоне проявляется повышенная чувствительность к последующему охлаждению как донорских, так и фетальных эритроцитов. Поскольку охлаждение до субнулевых температур донорских эритроцитов в растворах с осмолярностью ниже 750 мОсм/л, а фетальных ниже 840 мОсм/л не вызывает гемолиз, а их мембраны в этой области можно считать интактными [3,10], частичное разрушение гликокаликса эритроцитов на этапе прединкубации клеток в растворах сверхкритической концентрации NaCl вполне допустимо рассматривать как один из первичных пусковых механизмов гипертонического криогемолиза. Следствием повреждения внешних примембранных слоев клеток, вероятнее всего, могут быть нарушение белок-липидных взаимодействий в мембране и латеральное перераспределение ее компонентов, что отражается на особенностях структурно-фазовых превращений в мембране при охлаждении в температурном интервале 8-13°C и приводит к криогемолизу.

### Выводы

Таким образом, фетальные эритроциты человека приобретают чувствительность к последующему охлаждению на этапе их экспозиции в гипертонических растворах NaCl при комнатной температуре, что согласуется с основными закономерностями гипертонического криогемолиза эритроцитов взрослых доноров [1]. Однако благодаря наличию в фетальной крови значительного количества молодых эритроцитарных форм эти клетки обладают повышенной гипертонической криоустойчивостью.

### Литература

1. Гордиенко Е.А., Коваленко С.Е. Основные закономерности явления гипертонического криогемолиза // Пробл. криобиологии.– 1997.– №3.– С.3-7.

**Таблица 2.** Коэффициенты чувствительности фетальных эритроцитов человека к гипертоническому воздействию (I стадия гипертонического криогемолиза)

**Table 2.** Coefficients of human fetal erythrocyte sensitivity to hypertonic effect (II stage of hypertonic cryohemolysis)

Концентрация NaCl, М NaCl concentration, M	Время экспозиции, мин Exposure time, min				
	5	10	15	30	60
0,15	0,02	0,04	0,05	0,06	0,07
0,45	0,04	0,05	0,06	0,07	0,07
1,2	0,07	0,09	0,12	0,16	0,27
1,4	0,07	0,20	0,21	0,24	0,39
2,3	0,73	1,43	1,60*	1,90	2,85
3,42	10,25	12,39	14,13	14,50	14,88

**Примечание.** \* – сравниваемые данные.

**Note:** \* – the data under comparing.

When estimating the surface state of human donor's erythrocytes under conditions of NaCl hypertonic effect it was demonstrated [4], that in its solutions with 0.85 M concentration (1550 mOsm/l) and higher there was observed the destruction of external membrane adjacent erythrocyte layers, accompanying with the elimination into an extracellular medium of glycoproteins. An increased sensitivity to following cooling of both donor and fetal erythrocytes is manifested namely in this concentration zone. As cooling down to subzero temperatures of donor's erythrocytes in solutions with an osmolarity lower than 750 mOsm/l and 840 mOsm/l for fetal ones does not cause hemolysis and their membranes in this field can be considered as intact ones [3, 10], a partial destruction of erythrocyte glycocalyx at the stage of cell preincubation in the solution of NaCl extracritical concentration is acceptable to consider as one of primary trigger mechanisms of hypertonic cryohemolysis. The most likely result of impairment of external membrane adjacent cell layers may be the damage of protein-lipid interactions in a membrane and lateral redistribution of its components, that affects the peculiarities of structural phase transformations in a membrane during cooling within the temperature range of 8-13°C and results in cryohemolysis.

### Conclusions

Thus, human fetal erythrocytes gain the sensitivity to following cooling at the stage of their exposure in NaCl hypertonic solutions under room temperatures, that is correlated with main regularities of hypertonic cryohemolysis of adult donor's erythrocytes [1].

2. *Клиническая гематология* / Под ред. Шт.Берчану.– Бухарест : Мед. изд-во, 1985.- 1221 с.
3. *Кулешова Л.Г.* Гипертоническая устойчивость фетальных эритроцитов человека в электролитной среде // Пробл. криобиологии.– 2003.– № 4.– С. 20-27.
4. *Кулешова Л.Г.* Оценка состояния поверхности эритроцитов человека в гипертонической среде электролита. 2. Состояние внешних примембранных слоев // Вісник ХНУ.Біофіз.вісник.– 2003.– № 1.– С. 89-91.
5. *Пушкар Н.С., Белоус А.М., Иткин Ю.А. и др.* Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах.– Киев : Наук.думка, 1977.– 243 с.
6. *Справочник по переливанию крови и кровезаменителей* / Под ред. О.К. Гаврилова.– М.: Медицина, 1982.– 303 с.
7. *Minetti M., Ceccarini M., Di Stasi A.M.* Role of membrane thermotropic properties on hypertonic hemolysis and hypertonic cryohemolysis of human red blood cells // J. Cell. Biochem.– 1984.– № 25.– P. 61-72.
8. *Morris G.J., Farrant J.* Effects of cooling rate on thermal shock hemolysis // Cryobiology.– 1973.– Vol. 10, №2.– P. 119-125.
9. *Morris G.J., Coulson G., Meyer M.A., et al.* Cold shock – a widespread cellular reaction // Cryoletters.– 1983.– № 4.– P. 179-192.
10. *Takahashi T., Erbe E.F., Steere R.F. et al.* Further studies of thermal shock in human erythrocytes using freeze-fracture and ESR. // Cryobiology.– 1983.– Vol. 20, № 6.– P. 725-726.
11. *Takahashi T., Williams R.J.* Thermal shock hemolysis in human red cells. I. The effects of temperature, time and osmotic stress // Cryobiology.– 1983.– Vol. 20, N 5.– P. 507-520.

*Поступила 27.01.2004*

However, due the presence of a great number of young erythrocyte forms in fetal blood these cells have an increased hypertonic cryoresistance.

## References

1. *Gordienko E.A., Kovalenko S.E.* Basic rules of the event of posthypertonic cryohemolysis // Problems of Cryobiology.– 1997.– N3.– P.3-7.
2. *Clinical hematology* / Edited by Sh. Berchanu.- Bucharest: Med. izdatel'stvo, 1985.- 1221p.
3. *Kuleshova L.G.* Hypertonic resistance of human fetal erythrocytes in electrolyte medium//Problems of Cryobiology.– 2003.– N4.– P. 20-27.
4. *Kuleshova L.G.* Estimation of surface state of human erythrocytes in hypertonic medium of electrolyte. 2. State of external membrane adjacent layers // Visnyk of Kharkov National University. Biofizychny visnyk.– 2003.– N1.– P. 89-91.
5. *Pushkar N.S., Belous A.M., Itkin Yu.A. et al.* Low temperature crystallisation in biological systems.– Kiev: Naukova dumka, 1977.– 243 p.
6. *Reference book on blood and blood substitutive transfusion* / Edited by Gavrillov O.K.– Moscow: Meditsina, 1982.– 303 p.
7. *Minetti M., Ceccarini M., Di Stasi A.M.* Role of membrane thermotropic properties on hypertonic hemolysis and hypertonic cryohemolysis of human red blood cells // J. Cell. Biochem.– 1984.– N25.– P. 61-72.
8. *Morris G.J., Farrant J.* Effects of cooling rate on thermal shock hemolysis//Cryobiology.– 1973.– Vol.10, N2.– P. 119-125.
9. *Morris G.J., Coulson G., Meyer M.A. et al.* Cold shock – a widespread cellular reaction // Cryoletters.– 1983.– N4.– P. 179-192.
10. *Takahashi T., Erbe E.F., Steere R.F. et al.* Further studies of thermal shock in human erythrocytes using freeze-fracture and ESR // Cryobiology.– 1983.– Vol.20, N6.– P. 725-726.
11. *Takahashi T., Williams R.J.* Thermal shock hemolysis in human red cells. I. The effects of temperature, time and osmotic stress // Cryobiology.– 1983.– Vol.20, N5.– P. 507-520.

*Accepted in 27.01.2004*