

УДК 612.111.014.32:546.32-71

Н.М. Шпакова*, Н.В. Орлова, Е.Е. Нипот

Обезвоживание эритроцитов млекопитающих влияет на их чувствительность к механическому стрессу

UDC 612.111.014.32:546.32-71

N.M. Shpakova*, N.V. Orlova, E.Ye. Nipot

Dehydration of Mammalian Erythrocytes Affects Their Sensitivity to Mechanical Stress

Реферат: Исследована чувствительность эритроцитов человека, быка, крысы и лошади к действию механического стресса в средах, содержащих 0,15, 0,4 и 0,6 моль/л NaCl. Механический стресс эритроцитов млекопитающих в среде, содержащей 0,15 моль/л NaCl, приводит к потере клетками K⁺ от 30% для эритроцитов лошади до 60% для клеток быка. Максимальную устойчивость по показателю гемолиза к действию механического стресса проявляют эритроциты быка и лошади в среде, содержащей 0,15 моль/л NaCl. Показано, что обезвоживание эритроцитов человека, быка, крысы и лошади в средах 0,4 и 0,6 моль/л NaCl повышает чувствительность клеток к механическому стрессу. Наиболее чувствительны к увеличению осмотической нагрузки в условиях механического стресса по показателю гемолитического повреждения эритроциты быка и крысы, а по показателю выхода ионов калия – клетки лошади. Предполагается, что разная чувствительность эритроцитов млекопитающих к механическому стрессу в условиях осмотической нагрузки определяется видовыми особенностями транспорта воды и липидного состава эритроцитарных мембран. Сравнительный анализ влияния обезвоживания эритроцитов на их устойчивость к стрессовым факторам показал, что формирование стабильного состояния клеток (в среде, содержащей 0,4 моль/л NaCl) к действию гипертонического шока не обеспечивает их устойчивость в условиях механического стресса.

Ключевые слова: эритроциты млекопитающих, обезвоживание, механический стресс, катионы калия, гемолиз.

Реферат: Досліджено чутливість еритроцитів людини, бика, щура та коня до дії механічного стресу у середовищах, які містять 0,15, 0,4 та 0,6 моль/л NaCl. Механічний стрес еритроцитів ссавців у середовищі, яке містить 0,15 моль/л NaCl, приводить до втрати клітинами K⁺ від 30% для еритроцитів коня до 60% для клітин бика. Максимальну стійкість за показником гемолізу до дії механічного стресу виявляють еритроцити бика і коня у середовищі, яке містить 0,15 моль/л NaCl. Показано, що зневоднення еритроцитів людини, бика, щура та коня у середовищах 0,4 та 0,6 моль/л NaCl підвищує чутливість клітин до механічного стресу. Найбільш чутливі до збільшення осмотичного навантаження в умовах механічного стресу за показником гемолітичного пошкодження еритроцити бика і щура, за показником виходу іонів калію – клітини коня. Передбачається, що різна чутливість еритроцитів ссавців до механічного стресу в умовах осмотичного навантаження визначається видовими особливостями транспорту води і ліпідного складу еритроцитарних мембран. Порівняльний аналіз впливу зневоднення еритроцитів на їх стійкість до стресових чинників показав, що формування стабільного стану клітин (у середовищі, яке містить 0,4 моль/л NaCl) до дії гіпертонічного шоку не забезпечує їх стійкість в умовах механічного стресу.

Ключові слова: еритроцити ссавців, зневоднення, механічний стрес, катіони калію, гемолиз.

Abstract: Sensitivity of human, bovine, rat and equine erythrocytes to effect of mechanical stress in the media containing 0.15, 0.4 and 0.6 mol/l NaCl was studied. Mechanical stress of mammalian erythrocytes in the medium containing 0.15 mol/l NaCl results to the loss of K⁺ by cells: from 30% for equine erythrocytes and 60% for bovine cells. Bovine and equine erythrocytes in the medium, containing 0.15 mol/l NaCl show a maximum resistance on hemolysis index to mechanical stress effect. It has been shown that dehydration of human, bovine, rat, and equine erythrocytes in the media with 0.4 and 0.6 mol/l NaCl increases sensitivity of cells to mechanical stress. Bovine and rat erythrocytes are the most sensitive to an increase in osmotic load under mechanical stress on hemolytic damage index, and equine cells are the most sensitive to potassium ion outflux index. Different sensitivity of mammalian erythrocytes to mechanical stress under osmotic load is supposed to be determined by specific peculiarities of water transport and lipid composition of erythrocyte membranes. Comparative analysis of dehydration effect of erythrocytes on their resistance to stress factors showed that formation of stable state of cells (in the medium with 0.4 mol/l NaCl) to hypertonic shock effect did not provide their resistance under mechanical stress.

Key words: mammalian erythrocytes, dehydration, mechanical stress, potassium cations, hemolysis.

Отдел криофизиологии клетки, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015;
тел.: (+38 057) 373-41-35, факс: (+38 057) 373-30-84,
электронная почта: starling_nataly@mail.ru

Поступила 29.07.2014
Принята в печать 09.09.2014

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, №1. – С. 24–32.
© 2015 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

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

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;
tel.: +380 57 373 4135, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: starling_nataly@mail.ru

Received July, 29, 2014
Accepted September, 09, 2014

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2015. 25(1): 24–32.
© 2015 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

На биологические объекты при низкотемпературном консервировании действует целый ряд неблагоприятных факторов (высокие концентрации соли, механическое повреждение кристаллами льда, изменение pH и др.) [1], для изучения которых применяют модельные эксперименты. Так, для исследования влияния на клетки высоких концентраций соли, которые достигаются при вымораживании свободной воды, используют гипертонический шок [7].

Ранее было установлено, что начальное состояние эритроцитов млекопитающих определяет устойчивость клеток к действию гипертонического шока [2, 7, 9]. Так, после инкубирования клеток человека, крысы и лошади в солевых средах с относительно невысокой концентрацией (0,3–0,4 моль/л NaCl) они проявляют максимальную устойчивость к последующему действию гипертонического шока [5, 9], т. е. переходят в состояние, которое в дальнейшем будем называть «стабильным». Поскольку указанный эффект выявлен для эритроцитов разных видов млекопитающих [9], можно говорить о некоторой универсальности подхода, связанного с частичным обезвоживанием клеток, в формировании состояния стабильности эритроцитов млекопитающих к действию гипертонического шока.

Эритроциты человека чувствительны к действию механического стресса, что, в частности, проявляется в их разрушении при использовании систем искусственного кровообращения и обусловлено формированием мембранных пор, проницаемых для гемоглобина [18]. Механизм повреждения эритроцитов в условиях гипертонического шока также связывают с образованием трансмембранных пор [5, 9], на формирование которых предварительное частичное обезвоживание клеток может оказывать опосредованное влияние.

Поскольку устойчивость эритроцитов к действию как механического стресса, так и гипертонического шока связана с состоянием мембраны [5], представляло интерес исследовать степень влияния обезвоживания клеток на их устойчивость к механическому воздействию.

Цель работы – изучить влияние обезвоживания эритроцитов человека, быка, крысы и лошади в средах, содержащих 0,4 и 0,6 моль/л NaCl, на их чувствительность к механическому стрессу по показателям гемолиза и выхода катионов калия из клеток.

Материалы и методы

Для исследования использовали эритроциты, полученные из донорской крови человека (*Homo sapiens*), быка (*Bos taurus*), лошади (*Equus caballus*).

Several unfavourable factors, in particular, high saline concentrations, mechanical damage caused by ice crystals, changes in pH *etc.* [7] affect biological objects during low-temperature storage. To investigate those the model experiments are used. In particular, a hypertonic shock is applied to study the effect on cells of high saline concentrations occurring during free water freeze-out [15].

Previously, it has been found that an initial state of mammalian erythrocytes determines a cell resistance to a following hypertonic shock [1, 15, 17]. In so doing, incubation of human, rat and equine cells in saline media with relatively low concentrations (0.3–0.4 mol/l NaCl) results in developing of a maximum resistance to the following effect of hypertonic shock [14, 17], *i.e.* enter the state, which thereafter will be called as ‘stable’. Whereas this effect has been found for erythrocytes of different mammalian species [17], we suggest a certain versatility of the approach, associated with partial dehydration of cells in appearance of stability of mammalian erythrocytes against hypertonic shock effect.

Human erythrocytes are sensible to mechanical stress, that, in particular, manifests in their destruction when using the systems of artificial blood circulation and is based on formation of hemoglobin penetrable membrane pores [16]. Mechanism of erythrocytes damage under hypertonic shock has also been associated with the formation of transmembrane pores [14, 17], which could be indirectly affected by preliminary partial dehydration of cells.

Whereas erythrocytes resistance to the action of both mechanical stress and hypertonic shock is associated with a state of membrane [14], it is of interest to investigate how strongly the cell dehydration affects their resistance to mechanical stress.

The research aim was to study the dehydration effect of human, bovine, rat, equine erythrocytes in media containing 0.4 and 0.6 mol/l NaCl on their sensibility to mechanical stress in terms of indices of hemolysis and potassium cation outflux from cells.

Materials and methods

The research was performed in the erythrocytes derived from human (*Homo sapiens*), bovine (*Bos taurus*), equine (*Equus caballus*), rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and rat (*Rattus norvegicus*) blood preserved with Glugicir hemopreservative (Biofarma, Ukraine). The experiments in animals were performed according to the General Ethical Principles of Experiments in Animals, approved by the 5th National Congress on Bioethics (Kiev, 2013) and agreed with the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).



lus), кролика (*Oryctolagus cuniculus*) и крысы (*Rattus norvegicus*), заготовленной на гемоконсерванте «Глюгидир» («Биофарма», Украина). Эксперименты проведены в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными V Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2013) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

После удаления плазмы эритромаксу трижды отмывали путем центрифугирования (центрифуга ОПн-3У4.2, Кыргызстан; 3000 об/мин, 3 мин) в 10-кратном объеме физиологического раствора (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатный буфер, pH 7,4). Лейкоцитарную пленку и супернатант удаляли аспирацией. Эритроциты хранили в виде плотного осадка не более 4 ч при температуре 0°C. Все среды, используемые в работе, готовили на 0,01 моль/л фосфатном буфере, pH 7,4.

Клетки подвергали действию механического стресса (МС) путем перемешивания клеточной суспензии (гематокрит 20%) в емкости, заполненной пластиковыми шариками диаметром 5 мм, при комнатной температуре (22°C). Объем суспензии – 5 мл, количество шариков – 31. Перемешивание осуществляли с помощью магнитной мешалки ММ-5 (Россия), скорость вращения – 1200 об/мин [6]. Через 60 мин осуществляли отбор суспензии эритроцитов млекопитающих для определения выхода гемоглобина и катионов калия из клеток.

Уровень гемолиза эритроцитов измеряли спектрофотометрически при длине волны 543 нм и вычисляли в процентах. За 100%-й гемолиз принимали поглощение пробы, в которую добавляли тритон X-100 («Merck», Германия) в концентрации 0,1%.

Выход катионов калия из эритроцитов в условиях МС определяли с помощью ионметра универсального ЭВ-74 (Беларусь) с использованием ионселективного электрода ЭЛИС-121К и электрода сравнения ЭВЛ-1М3.1. Концентрацию катионов калия измеряли в супернатанте суспензии эритроцитов (гематокрит 20%). Для получения 100%-го показателя выхода внутриклеточных катионов калия эритроциты подвергали 3-разовому циклу замораживания-оттаивания.

Величину гематокрита суспензии эритроцитов определяли микрогематокритным методом [4] на центрифуге МГЦ-8 (Россия), осмоляльность растворов веществ – криоскопическим методом с использованием осмометра ОМКА-1Ц-01 (Украина).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы «Statistica» (версия 6.0). Экспериментальные данные представлены как медиана и интерквартильный интер-

After plasma removal the erythrocyte mass was thrice washed by centrifugation (centrifuge OPn-3U4.2, Kyrgyzstan, at 3000 rpm for 3 min) in a 10-fold volume of physiological solution (0.15 mol/l NaCl, 0.01 mol/l phosphate buffer, pH 7.4). Buffy coat layer and supernatant were aspirated. Erythrocytes were stored as a dense sediment not longer as 4 hrs under 0°C. All the media used in the work were prepared with 0.01 mol/l phosphate buffer, pH 7.4.

The cells were exposed to mechanical stress (MS) by mixing the cell suspension (20% hematocrit) in a container filled with plastic beads of 5 mm diameter at room temperature (22°C). Suspension volume was 5 ml, the number of beads made 31. Mixing was performed with a magnetic stirrer MM-5 (Russia), rotation rate was 1200 rpm [18]. After 60 min the mammalian erythrocyte suspension was removed and outflux of hemoglobin and potassium cations from the cells was assessed.

Erythrocyte hemolysis level was measured spectrophotometrically at 543 nm and expressed in percents. Absorption of erythrocytes sample supplemented with 0.1% triton X-100 (Merck, Germany) was assumed as 100% hemolysis.

Outflux of potassium cations from erythrocytes under MS was measured with universal ionometer EV-74 (Belarus) equipped with ion-selective electrode ELIS-121K and reference electrode EVL-1M3.1. Potassium cation concentration was measured in the supernatant of erythrocyte suspensions (20% hematocrit). Erythrocytes were exposed to 3-fold freeze-thawing cycle to obtain 100% release of intracellular potassium cations.

Hematocrit value of erythrocyte suspension was determined by microhematocrit method [10] using MGC-8 centrifuge (Russia). Osmolality of substances solutions was determined by cryoscopic method using osmometer ОМКА 1С-01 (Ukraine).

The obtained data were statistically processed using Statistica software (version 6.0). Experimental data were presented as median and interquartile range (Q1-Q3). Mann-Whitney test was used to examine the statistical significance of differences of the studied values. Correlation analysis using Pearson's coefficient was used to analyze the correlations among the studied parameters. Critical level of significance when testing statistical hypothesis was assumed as 0.05.

Nationally produced reagents of 'chemically pure' and 'pure for analysis' grades were used in the research.

Results and discussion

Erythrocytes of different mammalian species are sensitive to a transfer into solution containing 4.0 mol/l NaCl [8]. The level of erythrocyte hypertonic injury



вал (Q1–Q3). Для проверки статистической значимости различий исследуемых числовых показателей использовали критерии Манна-Уитни. Корреляционный анализ с использованием коэффициента Пирсона применяли для анализа связей между исследуемыми показателями. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез был принят равным 0,05.

В работе использовали реактивы отечественного производства квалификации «хч» и «чда».

Результаты и обсуждение

Эритроциты разных видов млекопитающих чувствительны к перенесению в раствор, содержащий 4,0 моль/л NaCl [3]. Уровень гипертонического повреждения эритроцитов зависит от их начального состояния, в частности от степени обезвоживания [9]. Эритроциты человека, крысы и лошади проявляют минимальную чувствительность к действию гипертонического шока после инкубирования в среде, содержащей 0,4 моль/л NaCl, и максимальную чувствительность – в 0,6 моль/л NaCl. Таким образом, использование сред разной осмоляльности позволяет получить клетки как в стабильном (устойчивы к действию гипертонического шока), так и в метастабильном (неустойчивы к действию гипертонического шока) состоянии. Следует отметить, что для эритроцитов быка стабильное состояние к гипертоническому шоку формируется в среде с более высоким значением концентрации NaCl (1,0 моль/л) [2].

В данном исследовании действию МС подвергали эритроциты млекопитающих, находящиеся в средах, содержащих 0,4 и 0,6 моль/л NaCl. На рис. 1 представлены значения гемолиза эритроцитов млекопитающих в условиях МС. В физиологической среде наибольшую устойчивость к МС проявляют клетки быка и лошади. При сочетанном действии 0,4 моль/л NaCl и МС среди исследуемых видов млекопитающих эритроциты лошади

depends on their initial state, particularly, the dehydration degree [17]. Human, rat, and equine erythrocytes exhibited minimum sensitivity to the action of hypertonic shock after incubation in the medium containing 0.4 mol/l NaCl, and maximum one was observed after treatment with 0.6 mol/l NaCl medium. Thus, the use of media with different osmolality allows to obtain the cells either in stable (hypertonic shock resistant) or metastable (hypertonic shock unstable) state. It should be noted that in case of bovine erythrocytes the hypertonic shock stable state could be formed after incubation in a medium with higher NaCl concentration (1.0 mol/l) [1].

This study highlighted the effect of MS on mammalian erythrocytes being in the media containing 0.4 and 0.6 mol/l NaCl. Fig. 1 represents the values of hemolysis of mammalian erythrocytes under MS conditions. In physiological medium the highest resistance to MS was exhibited by bovine and equine cells. Under com-

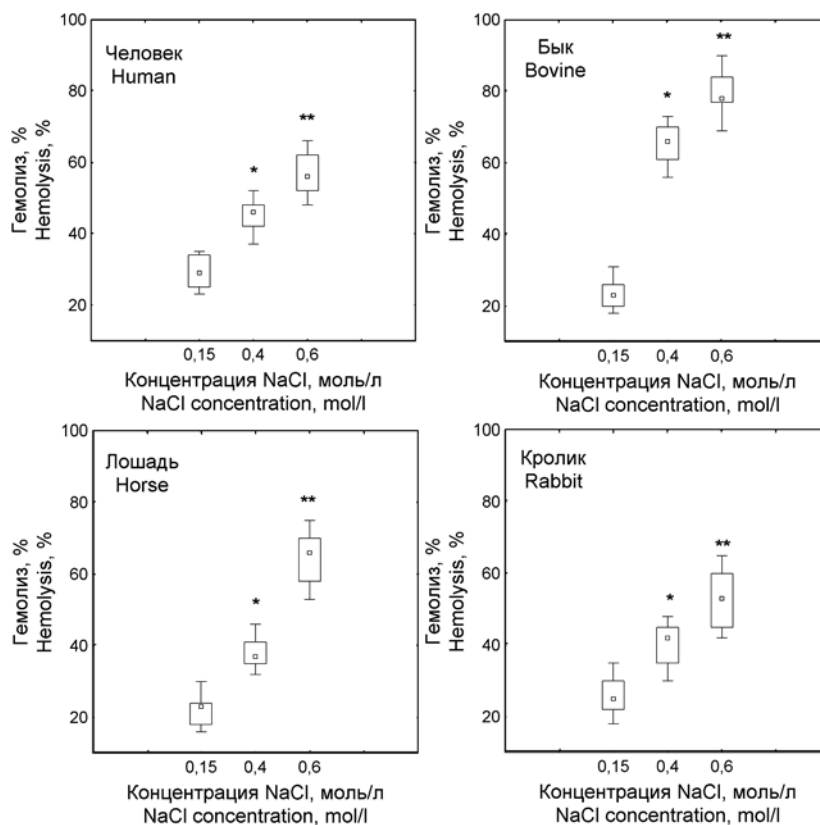


Рис. 1. Уровень гемолиза эритроцитов млекопитающих в средах, содержащих 0,15, 0,4 и 0,6 моль/л NaCl, при действии механического стресса: □ – медиана; [] – интерквартильный интервал (Q1–Q3), I – максимальное-минимальное значение; *, # – статистически значимые различия по сравнению с результатами, полученными в 0,15 и 0,4 моль/л NaCl соответственно ($p < 0,05$), количество наблюдений в каждой группе – 9.

Fig. 1. Level of hemolysis of mammalian erythrocytes in media containing 0.15, 0.4, 0.6 mol/l NaCl under mechanical stress: □ – median; [] – interquartile range (Q1–Q3); I – maximum-minimum value; *, # – statistically significant differences if compared with the results obtained in the 0.15 and 0.4 mol/l NaCl, respectively ($p < 0.05$), the number of observations in each group is 9.

характеризуются наибольшей устойчивостью, а клетки крысы – максимальным уровнем гемолитического повреждения. В результате комбинированного действия 0,6 моль/л NaCl и МС большую устойчивость проявляют клетки человека и лошади по сравнению с эритроцитами быка и крысы.

Механический стресс эритроцитов млекопитающих в 0,15 моль/л NaCl приводит к потере клетками K^+ , выраженной в разной степени: от 30% эритроцитами лошади до 60% клетками быка (рис. 2). При осмотической нагрузке (0,4 моль/л NaCl) потеря ионов калия эритроцитами человека, крысы и быка увеличивается до 80–90%, а клетками лошади – до 45%. Повышение осмотической нагрузки до 0,6 моль/л NaCl сопровождается потерей K^+ эритроцитами всех исследованных млекопитающих на уровне более 90%. Таким образом, в условиях МС осмотическая нагрузка (0,4 и 0,6 моль/л NaCl) по сравнению с физиологическим раствором значительно увеличивает выход K^+ из клеток всех млекопитающих.

В физиологической среде видовые различия реакции эритроцитов млекопитающих на действие МС выражены в большей степени по показателю выхода K^+ из клеток (рис. 2), чем по показателю гемолиза (см. рис. 1). В гипертонических средах видовые различия клеток проявляются, в первую очередь, в уровне гемолиза эритроцитов млекопитающих при МС (рис. 1, 2).

Анализ изменения уровня гемолиза и потери K^+ эритроцитами млекопитающих по мере увеличения концентрации соли в среде позволил выявить следующие особенности. В условиях МС при повышении концентрации соли в среде увеличиваются оба показателя повреждения клеток по сравнению с физиологической средой. В растворах, содержащих 0,4 и 0,6 моль/л NaCl, максимальное повышение уровня гемолиза наблюдается для эритроцитов быка (в 2,9 и 3,4 раза) и крысы (в 2,8 и 3 раза), минимальное – для

combined effect of 0.4 mol/l NaCl and MS among the studied mammalian species equine erythrocytes were characterized by the highest resistance and the rat cells exhibited the maximum level of hemolytic damage. In case of a combined action of 0.6 mol/l NaCl and MS human and equine cells had higher resistance if compared with bovine and rat erythrocytes.

Mechanical stress of mammalian erythrocytes in 0.15 mol/l NaCl led to the loss of K^+ by cells expressed differently: from 30% in equine erythrocytes to 60% in bovine cells (Fig. 2). Under the osmotic load (0.4 mol/l NaCl), potassium ion loss by human, rat and bovine erythrocytes increased up to 80–90%, and in equine cells it did up to 45%. Increasing the osmotic load up to 0.6 mol/l NaCl was accompanied by K^+ loss by erythrocytes of all the studied mammals at the level of more than 90%. Thus, under MS the osmotic load (0.4 and 0.6 mol/l NaCl) significantly increased outflux

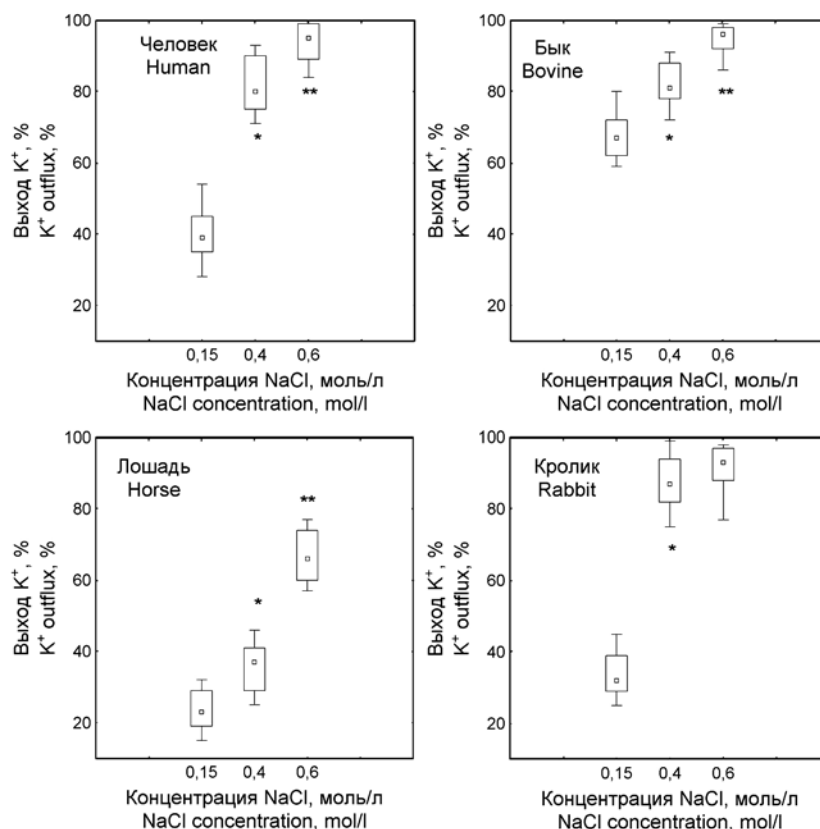


Рис. 2. Уровень выхода K^+ из эритроцитов млекопитающих в средах, содержащих 0,15, 0,4 и 0,6 моль/л NaCl, при действии механического стресса: □ – медиана; [] – интерквартильный интервал (Q1–Q3), [] – максимальное-минимальное значение; *, ** – статистически значимые различия по сравнению с результатами, полученными в 0,15 и 0,4 моль/л NaCl соответственно ($p < 0,05$), количество наблюдений в каждой группе – 9.

Fig. 2. Level of K^+ outflux of mammalian erythrocytes in media containing 0.15, 0.4, 0.6 mol/l NaCl under mechanical stress: □ – median, [] – interquartile range (Q1–Q3), [] – maximum-minimum value; *, ** – statistically significant differences if compared with the results obtained in the 0.15 and 0.4 mol/l NaCl, respectively ($p < 0.05$), the number of observations in each group is 9.



клеток человека (в 1,6 и 1,9 раза) (см рис. 1). При этом максимальное увеличение выхода K^+ при повышении осмотической нагрузки характерно для эритроцитов лошади (в 2,1 и 4,4 раза), а минимальное – для клеток быка (в 1,2 и 1,4 раза) (рис. 2).

Разная механическая устойчивость эритроцитов млекопитающих может быть связана с видовыми особенностями клеток. Так, эритроциты быка и лошади, которые имеют минимальный уровень механического гемолиза (в 0,15 моль/л NaCl) (см. рис. 1), характеризуются высоким значением поверхностно-объемного отношения [12, 14, 15] и низким содержанием внутриклеточной воды [17]. При искусственном уменьшении содержания внутриклеточной воды в результате инкубирования эритроцитов в гипертонических средах (0,4 и 0,6 моль/л NaCl) их устойчивость к МС не повышается (см. рис. 1).

Анализ потери K^+ эритроцитами человека и животных, находящимися в 0,15 моль/л NaCl, при действии МС показал максимальный уровень выхода K^+ из клеток быка (рис. 2), что может быть обусловлено особенностями внутриклеточного катионного состава эритроцитов млекопитающих. В отличие от эритроцитов большинства млекопитающих, клетки которых характеризуются высоким содержанием калия, эритроциты быка в качестве доминирующего внутриклеточного катиона содержат натрий [13].

Как видно из рис. 1 и 2, эритроциты человека и животных в растворах, содержащих 0,4 и 0,6 моль/л NaCl, менее устойчивы к МС по сравнению с клетками в физиологической среде (0,15 моль/л NaCl), что согласуется с результатами, полученными другими методами [5, 8]. Так, при 6-кратном продавливании эритроцитов крысы через иглу диаметром 0,3 мм показано увеличение механического гемолиза клеток в среде, содержащей 0,55 моль/л NaCl, по сравнению с клетками в физиологическом растворе [8]. Выявленный факт увеличения механического повреждения эритроцитов человека и животных в условиях гипертонии (см. рис. 1, 2) может быть связан с изменением характеристик эритроцитарных мембран в гипертонических средах [5, 19]. В частности, показаны уменьшение текучести [19] и увеличение динамической жесткости [5] эритроцитарных мембран при повышении концентрации соли в среде.

Установлено, что между величинами коэффициента трансмембранной диффузии воды при использовании РСМБС (25°C) [10, 11] и значениями механического гемолиза эритроцитов млекопитающих в 0,4 моль/л NaCl (см. рис.1) наблюдается сильная корреляционная связь ($r = 0,9886$) (рис. 3).

of K^+ from cells of all the mammals if compared with physiological solution.

In physiological medium the found species-specific differences of mammalian erythrocytes response on MS effect were more prominent in terms of K^+ outflux from cells (Fig. 2) than in case of hemolysis index (Fig. 1). In hypertonic media the species-specific differences were manifested, mainly, by the level of hemolysis of mammalian erythrocytes under MS conditions (Fig. 1 and 2).

Analysis of changes in hemolysis level and the loss of K^+ by mammalian erythrocytes accompanying the increase in medium saline concentration revealed the following peculiarities. Under conditions of MS the rise in medium saline concentration was subtended with an increase of both indices of cell damage if compared with the physiological medium. In the solutions containing 0.4 and 0.6 mol/l NaCl a maximum rise in hemolysis level was observed for bovine (in 2.9 and 3.4 times) and rat erythrocytes (in 2.8 and 3 times), the minimum increase was found in human cells (in 1.6 and 1.9 times) (Fig. 1). Herewith, a maximum increase of K^+ outflux, which was found at rising of osmotic load, was characteristic for equine erythrocytes (in 2.1 and 4.4 times), while the minimum one was characteristic for bovine cells (in 1.2 and 1.4 times) (Fig. 2).

Various mechanical resistances of mammalian erythrocytes may be associated with species peculiarities of the cells. Thus, bovine and equine erythrocytes, which had a minimum level of mechanical hemolysis (0.15 mol/l NaCl) (Fig. 1), possessing high values of surface-volume ratio [4, 9, 11] and a low content of intracellular water [13]. Artificial reduction of intracellular water content due to incubation of erythrocytes in a hypertonic media (0.4 and 0.6 mol/l NaCl) did not result in an increase of their resistance to MS (Fig. 1).

Analysis of K^+ loss by human and animal erythrocytes being in 0.15 mol/l NaCl and subjected to MS effect showed the maximum level of K^+ outflux in case of bovine cells (Fig. 2), that might be stipulated by the peculiarities of intracellular cation composition of several mammalian erythrocytes. In contrast to erythrocytes of most mammals, the cells of which have a high content of potassium, bovine erythrocytes have sodium as the predominant intracellular cation [5].

Fig. 1 and 2 show that human and animal erythrocytes are less resistant to MS in solutions containing 0.4 and 0.6 mol/l NaCl if compared to the cells in physiological medium (0.15 mol/l NaCl), that is consistent with the results obtained by other methods [6, 14]. In particular, 6-fold pressing of rat erythrocytes through 0.3 mm diameter needle was shown to be accompanied with an increase of mechanical hemolysis



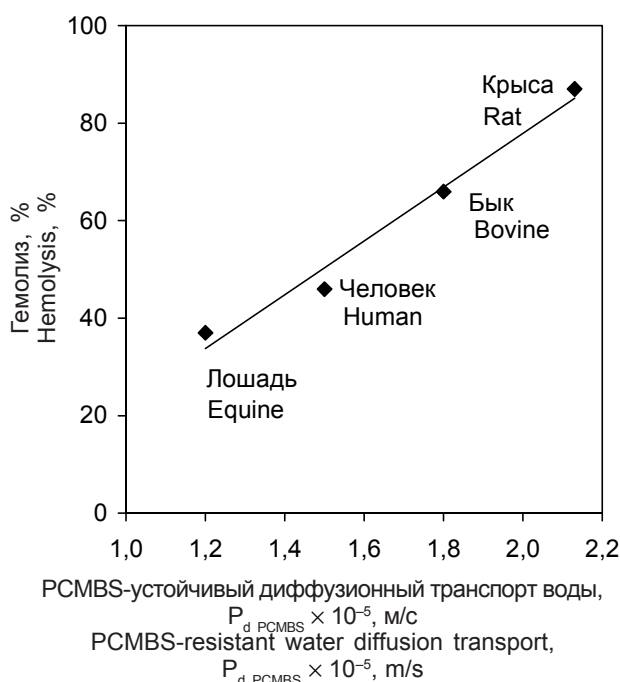
Рис. 3. Взаимосвязь показателей механического гемолиза эритроцитов млекопитающих в среде, содержащей 0,4 моль/л NaCl, и коэффициента РСМБС-устойчивого диффузионного транспорта воды.

Fig. 3. Indices of mechanical hemolysis of mammalian erythrocytes in medium containing 0.4 mol/l NaCl vs. coefficients of PCMBС-resistant diffusion transport of water.

Поскольку РСМБС ингибирует белковые каналы транспорта воды, можно полагать, что значения гемолитического повреждения эритроцитов млекопитающих при МС коррелируют с величинами коэффициента трансмембранной диффузии воды через липидный бислой мембраны. Следует отметить, что эритроциты крысы имеют максимальный уровень механического повреждения при осмотической нагрузке (0,4 и 0,6 моль/л NaCl) (см. рис. 1, 2). Среди исследуемых млекопитающих клетки крысы характеризуются высокими значениями коэффициента диффузионного транспорта воды через эритроцитарную мембрану, а также коэффициента диффузионного транспорта воды как через липидный, так и через белковый компоненты мембраны (25°C) [10, 11]. Кроме того, эритроциты крысы имеют высокое содержание аквапорина I (белок полосы 4.5), через который осуществляется транспорт воды [16]. Таким образом, можно полагать, что высокая чувствительность эритроцитов крысы к действию МС связана с описанными свойствами мембран.

Эритроциты млекопитающих с высоким содержанием неламеллярных липидов в мембране устойчивы к температурно-осмотическому стрессу [9], что определяется способностью этих липидов образовывать гексагональные структуры в ламеллярной упаковке липидного бислоя. Такие структуры «нарушают» непрерывность липидного бислоя вследствие чего изменяются физические параметры его растяжимости (мембрана становится более лабильной) [20]. Последнее позволяет снизить напряжение на мембране, возникающее в условиях температурно-осмотического стресса, и предотвратить развитие трансмембранных пор. Мембраны эритроцитов крысы, которые достаточно чувствительны к МС (см. рис. 1, 2), характеризуются низким содержанием неламеллярных липидов (фосфатидилэтаноламин, сфингомиелин) [21]. По-видимому, эту особенность можно рассматривать в качестве одного из факторов, препятствующих адаптации клеток крысы к действию МС.

Анализ экспериментальных данных показал зависимость устойчивости эритроцитов человека и животных к действию МС не только от видовых особенностей исследуемых эритроцитов, но и от



of cells in medium containing 0.55 mol/l NaCl if compared with the cells in physiological solution [6]. Revealed fact of the increased mechanical injury of human and animal erythrocytes under hypertonic conditions (Fig. 1, 2) may be associated with the changed characteristics of erythrocyte membranes in hypertonic media [14, 19]. In particular, a decreased fluidity [19] and increased dynamic rigidity [14] of erythrocyte membranes was shown after increasing the medium saline concentration.

A strong correlation ($r = 0.9886$) (Fig. 3) was established between the values of transmembrane water diffusion coefficient in presence of PCMBС (25°C) [2, 3] and mechanical hemolysis of mammalian erythrocytes in 0.4 mol/l NaCl (Fig. 1). As far as PCMBС inhibits protein channels of water transport, it can be assumed that the values of hemolytic damage of mammalian erythrocytes during MS correlate with the coefficient of transmembrane diffusion of water through membrane lipid bilayer. It should be noted that rat erythrocytes showed a maximum level of mechanical damage under osmotic load (0.4 and 0.6 mol/l NaCl) (Fig. 1, 2). Among the studied mammals the rat cells were characterized by high values of coefficient of water diffusion transport through erythrocyte membrane, as well as coefficient of water diffusion transport through both lipid and protein components of membrane (25°C) [2, 3]. Moreover, the rat erythrocytes were shown to have a high content of aquaporin I (band 4.5 protein), realizing the water transport [12]. Thus, it could be assumed that a high sensitivity of rat erythrocytes to MS effect was associated with the described properties of membranes.



состояния клеток, формирующегося под действием определенной осмоляльности внешней среды. Таким образом, эндогенные и экзогенные факторы могут влиять прямо или опосредованно на устойчивость клеток к действию стресса.

При частичном удалении внутриклеточной воды эритроциты защищены от гипертонического повреждения [2, 7, 9], а в случае МС защитный эффект частичного обезвоживания эритроцитов не проявляется (см. рис. 1, 2). Таким образом, выявленное в условиях гипертонического стресса состояние «стабильности» эритроцитов млекопитающих [9] не является универсальным в условиях действия МС.

Выводы

Предварительное обезвоживание эритроцитов млекопитающих увеличивает их чувствительность к действию МС. В случае повышения концентрации соли в среде при МС максимальное повышение уровня гемолиза наблюдается для эритроцитов быка и крысы, а минимальное – для клеток человека. Максимальное увеличение выхода K^+ при повышении осмотической нагрузки характерно для эритроцитов лошади, а минимальное – для клеток быка.

Частичное обезвоживание эритроцитов млекопитающих в среде, содержащей 0,4 моль/л NaCl, которое приводит к формированию стабильного состояния эритроцитов к действию гипертонического шока, не обеспечивает устойчивость клеток в условиях МС.

Литература

1. Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины /Под ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 207–228.
2. Александрова Д.И., Шпакова Н.М. Влияние предварительного обезвоживания эритроцитов человека и быка на устойчивость к гипертоническому шоку при разных температурах // Вісник проблем біології і медицини. – 2007. – №1. – С. 73–77.
3. Ершов С.С., Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Чувствительность эритроцитов млекопитающих к изменению температурных и осмотических условий среды // Проблемы криобиологии. – 2004. – №3. – С. 51–57.
4. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: справочник / Под ред. И.П. Кондрахина. – М., 2004. – 520 с.
5. Панталер Е.Р. Исследование устойчивости дегидратированных эритроцитов к действию осмотического и механического стресса: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1996. – 24 с.
6. Пат. 52701, Україна, МПК 8 G 01 N 33/48. Спосіб деструкції еритроцитів / Н.М. Шпакова, Н.В. Орлова, Д.І. Александрова; заявник і патентовласник Інститут проблем криобіології і криомедицини Національної академії наук України. – № u 2010 00983; заявл. 01.02.2010; опубл. 10.09.2010, Бюл. №17.

Mammalian erythrocytes with a high content of non-lammelar lipids in membrane are resistant to temperature and osmotic stress [17], that is mainly caused by the ability of these lipids to form hexagonal structures in lipid bilayer lamellar packing. Such structures disturb the regularity of lipid bilayer thereby physical parameters of its extensibility (membrane becomes more labile) are changed [20]. The latter allows to reduce the tension on membrane arising under temperature and osmotic stress and to prevent the expansion of transmembrane pores. Membranes of rat erythrocytes, being mostly sensitive to MS (Fig. 1, 2), are characterized by a low content of non-lammelar lipids (phosphatidylethanolamine, sphingomyelin) [21]. This feature can be evidently regarded as one of the factors preventing a rat cell adaptation to MS effect.

The analysis of experimental data showed that human and animal erythrocyte resistance to MS effect depends not only on the species-specific features of the studied erythrocytes, but also on a cell state, formed by the action of a certain osmolality of external environment. Thus, endogenous and exogenous factors may affect either directly or indirectly the cell resistance to stress.

Partial removal of intracellular water protects the erythrocytes from hypertonic damage [1, 15, 17], but under MS conditions no protective effect of partial dehydration of erythrocytes was manifested (Fig. 1, 2). Thus, the found state of ‘stability’ of mammalian erythrocytes under hypertonic stress [17], could not be assumed as universal at least under action of MS.

Conclusions

Preliminary dehydration of mammalian erythrocytes increases their sensitivity to MS action. When increasing medium saline concentration at MS a maximum rise of hemolysis level was observed in bovine and rat erythrocytes, and a minimum one in human cells. Maximum rise of K^+ outflux under increasing osmotic load was characteristic for equine erythrocytes, and minimum one was for bovine cells.

Partial dehydration of mammalian erythrocytes in the medium containing 0.4 mol/l NaCl, resulting in the formation of a stable state of erythrocytes to the effect of a hypertonic shock, did not provide the same cell resistance under conditions of MS.

References

1. Alexandrova D.I., Shpakova N.M. Effect of preliminary dehydration of human and bovine erythrocytes on cell resistance to hypertonic shock under different temperatures. *Visnyk Problem Biologii i Medytsyny* 2007; 1: 73–77.
2. Benga G., Borza T. Diffusional water permeability of mammalian red blood cells. *Comp Biochem Physiol B* 1995; 112 (4): 653–659.



7. Поздняков В.В., Бондаренко В.А. Взаимосвязь между исходными осмотическими условиями среды и чувствительностью эритроцитов к гипертоническому стрессу в 4.0 М NaCl // Криобиология. – 1989. – №1. – С. 47–49.
8. Федосова С.Н., Кудокоцева Е.В. Модифицирующее влияние курантила на осмотическую чувствительность эритроцитов // Проблемы криобиологии. – 1995. – №1 – С. 27–31.
9. Шпакова Н.М. Температурна та осмотична стійкість еритроцитів різних видів ссавців: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. – Харків, 2014. – 44 с.
10. Benga G., Borza T. Diffusional water permeability of mammalian red blood cells // *Comp. Biochem. Physiol. B.* – 1995. – Vol. 112, №4. – P. 653–659.
11. Benga Gh., Matei H., Frentescu L. et al. Comparative nuclear magnetic resonance studies of diffusional water permeability of red blood cells from different species. XI. Horses introduced to Australia and European horses (*Equus caballus*) // *Comp. Hematol. Int.* – 2000. – Vol. 10. – P. 138–143.
12. Betticher D.C., Geiser J. Resistance of mammalian red blood cells of different size to hypertonic milieu // *Comp. Biochem. Physiol. A.* – 1989. – Vol. 93, №2. – P. 429–432.
13. Bogner P., Sipos K., Ludany A. et al. Steady-state volumes and metabolism-independent osmotic adaptation in mammalian erythrocytes // *Eur. Biophys. J.* – 2002. – Vol. 31, №2. – P. 145–152.
14. Jones D.A. The importance of surface area/volume ratio to the rate of oxygen uptake by red cells // *J. Gen. Physiol.* – 1979. – Vol. 74, №5. – P. 643–646.
15. Kowluru R., Bitensky M.W., Kowluru A. et al. Reversible sodium pump defect and swelling in the diabetic rat erythrocyte: Effects on filterability and implications for microangiopathy // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1989. – Vol. 86, №9. – P. 3327–3331.
16. Matei H., Frentescu L., Benga Gh. Comparative studies of the protein composition of red blood cell membranes from eight mammalian species // *J. Cell. Mol. Med.* – 2000. – Vol. 4, №4. – P. 270–276.
17. Miseta A., Bogner P., Berenyi E. et al. Relationship between cellular ATP, potassium, sodium and magnesium concentrations in mammalian and avian erythrocytes // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1993. – Vol. 1175, №2. – P. 133–139.
18. Sakota D., Sakamoto R., Sobajima N. et al. Mechanical damage of red blood cells by rotary pumps: selective destruction of aged red blood cells and subhemolytic trauma // *Artif. Organs.* – 2008. – Vol. 32, №10. – P. 785–791.
19. Takahashi T., Noji S., Erbe E. F. et al. Cold shock hemolysis in human erythrocytes studied by spin probe method and freeze-fracture electron microscopy // *Biophys. J.* – 1986. – Vol. 49, №2. – P. 403–410.
20. Tan Y., Sun D., Wang J., Huang W. Mechanical characterization of human red blood cells under different osmotic conditions by robotic manipulation with optical tweezers // *IEEE Transactions on Biomedical Engineering.* – 2010. – Vol. 57, №7. – P. 1816–1825.
21. Wessels J.M.C., Veerkamp J.H. Some aspects of the osmotic lysis of erythrocytes III. Comparison of glycerol permeability and lipid composition of red blood cell membranes from eight mammalian species // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1973. – Vol. 291, №1. – P. 190–196.
3. Benga Gh., Matei H., Frentescu L. et al. Comparative nuclear magnetic resonance studies of diffusional water permeability of red blood cells from different species. XI. Horses introduced to Australia and European horses (*Equus caballus*). *Comp. Hematol. Int.* 2000; 10: 138–143
4. Betticher D.C., Geiser J. Resistance of mammalian red blood cells of different size to hypertonic milieu. *Comp. Biochem. Physiol. A* 1989; 93 (2): 429–432.
5. Bogner P., Sipos K., Ludany A. et al. Steady-state volumes and metabolism-independent osmotic adaptation in mammalian erythrocytes. *Eur. Biophys. J* 2002; 31 (2): 145–152.
6. Fedosova S.N., Kudokotseva E.V. Modifying action of curantyl on the osmotic susceptibility of red blood cells. *Problems of Cryobiology* 1995; (1): 27–31.
7. Goltsev A.N., editor. *Current Problems of Cryobiology and Cryomedicine.* Kharkov; 2012.
8. Ershov S.S., Orlova N.V., Shpakova N.M. Mammalian erythrocyte sensitivity to change in temperature and osmotic medium conditions. *Problems of Cryobiology* 2004; 3: 51–57.
9. Jones D.A. The importance of surface area/volume ratio to the rate of oxygen uptake by red cells. *J. Gen. Physiol* 1979; 74 (5): 643–646.
10. Kondrahina I.P., editor. *Methods of veterinary clinical laboratory diagnostics: a handbook.* Moscow; 2004.
11. Kowluru R., Bitensky M.W., Kowluru A. et al. Reversible sodium pump defect and swelling in the diabetic rat erythrocyte: Effects on filterability and implications for microangiopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989; 86 (9): 3327–3331.
12. Matei H., Frentescu L., Benga Gh. Comparative studies of the protein composition of red blood cell membranes from eight mammalian species. *J. Cell. Mol. Med* 2000; 4 (4): 270–276.
13. Miseta A., Bogner P., Berenyi E. et al. Relationship between cellular ATP, potassium, sodium and magnesium concentrations in mammalian and avian erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1993; 1175 (2): 133–139.
14. Pantaler E.R. Study of the resistance of dehydrated red blood cells to the effect of osmotic and mechanical stress. [dissertation]. Kharkiv; 1996.
15. Pozdnyakov V.V., Bondarenko V.A. The relationship between initial osmotic medium conditions and erythrocytes sensitivity to hypertonic stress in 4 M NaCl. *Kriobiologiya* 1989; 1: 47–49.
16. Sakota D., Sakamoto R., Sobajima N. et al. Mechanical damage of red blood cells by rotary pumps: selective destruction of aged red blood cells and subhemolytic trauma. *Artif. Organs* 2008; 32 (10): 785–791.
17. Shpakova N.M. Temperature and osmotic resistance of erythrocytes of different mammalian species. [dissertation]. Kharkiv; 2014.
18. Shpakova N.M., Orlova N.V., Alexandrova D.I., inventors. Method of destruction of red blood cells. Patent of Ukraine №52701, IPC 8G01N33/48. 2010 September 10.
19. Takahashi T., Noji S., Erbe E. F. et al. Cold shock hemolysis in human erythrocytes studied by spin probe method and freeze-fracture electron microscopy. *Biophys. J* 1986; 49 (2): 403–410.
20. Tan Y., Sun D., Wang J., Huang W. Mechanical characterization of human red blood cells under different osmotic conditions by robotic manipulation with optical tweezers. *IEEE Transactions on biomedical engineering* 2010; 57(7): 1816–1825.
21. Wessels J.M.C., Veerkamp J.H. Some aspects of the osmotic lysis of erythrocytes III. Comparison of glycerol permeability and lipid composition of red blood cell membranes from eight mammalian species. *Biochim. Biophys. Acta* 1973; 291(1): 190–196.

