

УДК 577.352.4:577.352.4:576.31:57.043

Н.Г. Землянских^{1*}, И.Ф. Коваленко², Л.А. Бабийчук¹

Особенности модификации геометрических параметров и изменения осмотической хрупкости эритроцитов человека под влиянием сахарозы и ПЭГ-1500

UDC 577.352.4:577.352.4:576.31:57.043

N.G. Zemlianskykh^{1*}, I.F. Kovalenko², L.A. Babijchuk¹

Peculiarities of Modifications in Geometric Parameters and Changes in Osmotic Fragility of Human Erythrocytes Following Their Exposure in Sucrose and PEG-1500 Solutions

Реферат: В работе изучали влияние полиэтиленгликоля с м. м. 1500 (ПЭГ-1500) и сахарозы на изменение геометрических параметров и осмотической хрупкости эритроцитов человека. При равных массовых долях двух веществ сахароза вызывала более выраженные изменения в распределении эритроцитов по показателям прямого светорассеивания (FSC) в сравнении с ПЭГ. Тем не менее, ПЭГ индуцировал сдвиг распределения эритроцитов по индексу сферичности в направлении сферических типов клеток, а также повышал осмотическую хрупкость эритроцитов относительно интактных и инкубированных в присутствии сахарозы клеток. Превалирующей направленностью модификации формы в присутствии ПЭГ был стоматоцитоз, в то время как влияние сахарозы приводило к доминированию дегидратированных уплощенных клеток. Различия внешних проявлений ответа эритроцитов на растворы ПЭГ и сахарозы, сопровождаемые неодинаковыми изменениями осмотической хрупкости, свидетельствуют о роли структурных модификаций мембран, индуцированных криопротекторами, в стабилизации клеток при последующем замораживании.

Ключевые слова: эритроцит, геометрические параметры, криопротекторы, полиэтиленгликоль, сахароза, осмотическая хрупкость.

Реферат: У роботі вивчали вплив поліетиленгліколя м. м. 1500 (ПЕГ-1500) і сахарози на зміну геометричних параметрів та осмотичної крихкості еритроцитів людини. При рівних масових частках двох речовин сахароза викликала більш виражені зміни в розподілі еритроцитів за показниками прямого світлорозсіювання (FSC) в порівнянні з ПЕГ. Проте ПЕГ індукував зсув розподілу еритроцитів за індексом сферичності в напрямку сферичних типів клітин, а також підвищував осмотичну крихкість еритроцитів щодо інтактних і інкубованих у присутності сахарози клітин. Переважаючою спрямованістю модифікації форми в присутності ПЕГ був стоматоцитоз, у той час як вплив сахарози призводив до домінування дегідратованих сплюснених клітин. Відмінності зовнішніх проявів відповіді еритроцитів на розчини ПЕГ і сахарози супроводжуються неоднаковими змінами осмотичної крихкості, свідчать про роль структурних модифікацій мембран, індукованих криопротекторами, у стабілізації клітин при подальшому заморожуванні.

Ключові слова: еритроцит, геометричні параметри, криопротектори, поліетиленоксид, сахароза, осмотична крихкість.

Abstract: The effect of the polyethylene glycol with a molecular weight of 1500 (PEG-1500) and sucrose on the changes in geometric parameters and osmotic fragility of human erythrocytes was studied. At equal mass fractions of two substances, sucrose caused more pronounced changes in the distribution of erythrocytes according to direct light scattering (FSC) in comparison with PEG. Nevertheless, PEG induced a shift in the distribution of erythrocytes according to the sphericity index in the direction of the spherical cell types, and also increased the osmotic fragility of the erythrocytes relative to the intact and incubated in the presence of sucrose cells. Stomatocytosis was the prevailing trend of the shape modification in the PEG presence, while the effect of sucrose led to the dominance of dehydrated flattened cells. Differences in the external manifestations of the erythrocyte response to PEG and sucrose solutions, accompanied by unequal changes in osmotic fragility, indicate the role of structural membrane modifications induced by cryoprotectants in cell stabilization during subsequent freezing.

Key words: erythrocyte, geometric parameters, cryoprotectants, polyethylene glycol, sucrose, osmotic fragility.

Для защиты эритроцитов человека от влияния неблагоприятных факторов криоконсервирования в большинстве протоколов используют эндоцеллюлярный криопротектор глицерол [21, 27], который легко проникает через плазматическую мембрану

To protect human erythrocytes against unfavorable effect of cryopreservation factors, most protocols exploit the endocellular cryoprotective agent glycerol [17, 23], which easily penetrates the plasma membrane of these cells. However, in order to maintain an osmotic stability

¹Отдел криоцитологии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Отдел низкотемпературного консервирования, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52,
электронная почта: nzemliansky@gmail.com

¹Department of Cryocytology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

²Department of Low Temperature Preservation, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 3737435, fax: +380 57 373 5952,
e-mail: nzemliansky@gmail.com

Поступила 13.06.2017

Принята в печать 30.10.2017

Received June, 13, 2017

Accepted October, 30, 2017

© 2017 N.G. Zemlianskykh 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.

данных клеток. Однако для поддержания осмотической стабильности эритроцитов в физиологических условиях криопротекторный агент необходимо удалять из размороженных клеточных суспензий, что является длительной и трудоемкой процедурой, а также приводит к значительной потере клеток. Поэтому поиск новых криопротекторов для эритроцитов человека все еще остается актуальным.

В настоящее время при разработке безотмывочных методов криоконсервирования клеток в качестве потенциальных экзоцеллюлярных низко-токсичных криопротекторов, которые позволяют использовать криоконсервированные клетки без удаления защитных соединений, активно исследуются такие вещества, как сахароза, маннитол, полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, гидроксипропилкрахмал и декстран [9, 16, 28]. Одним из наиболее перспективных криопротекторов для эритроцитов человека может быть полиэтиленгликоль с м. м. 1500 (ПЭГ-1500), применение которого обеспечивает высокий уровень сохранности клеток после размораживания [1].

Следует отметить, что криозащитные свойства конкретных соединений не являются универсальными для различных клеток. В частности, сахароза, используемая в качестве криопротектора для некоторых типов клеток, не способна эффективно защищать эритроциты человека при низких температурах в отличие от ПЭГ-1500. В связи с этим возникает вопрос, насколько различается действие данных соединений на эритроциты и в какой мере эти различия могут определять стабилизацию или дестабилизацию клеток в стрессовых условиях замораживания-отогрева.

Известно, что криопротекторные вещества влияют на активность различных ферментов [14] и систем мембранного транспорта [4, 5, 10], а также способствуют структурным модификациям мембранных липидов [17, 18] и белков цитоскелета [26]. В результате структурно-функциональных перестроек отдельных субклеточных систем под влиянием криопротекторов могут изменяться объем и форма клеток, а также физические свойства плазматических мембран, определяющие механическую стабильность и деформируемость эритроцитов. Связь физических свойств мембран эритроцитов с их геометрическими параметрами подтверждается результатами исследований различных патологий, возникших вследствие дефектов белков мембрано-цитоскелетного комплекса, при которых отмечаются трансформация дискоидной формы эритроцитов и нарушение механоэластических свойств мембраны [19]. Такого рода изменения могут играть важную роль и в выживании

of erythrocytes under physiological conditions, the cryoprotective agent must be removed from thawed cell suspensions, that is a long and time-consuming procedure, and also leads to a significant loss of cells. Therefore, the search for new cryoprotectants for human erythrocytes is still relevant.

Nowadays, development of the wash-free methods for cell cryopreservation actively involves such substances as sucrose, mannitol, polyethylene glycol, polyvinylpyrrolidone, hydroxyethyl starch and dextran as the potential extracellular low-toxic cryoprotectants, enabling the use of cryopreserved cells without removing protective compounds [5, 12, 24]. One of the most promising cryoprotectants for human erythrocytes can be polyethylene glycol with a molecular weight of 1500 (PEG-1500), the use of which provides a high level of post-thaw cell survival [1].

It should be noted that cryoprotective properties of certain compounds are not common for all the cell types. In particular, sucrose, used as a cryoprotectant for some types of cells, was not shown to possess any effect in protection of human erythrocytes at low temperatures, unlike PEG-1500. In this connection, the question arises, namely what is the difference in the effects of these compounds on erythrocytes and to what extent these differences can determine the stabilization or destabilization of cells under stress conditions of freeze-thawing.

The cryoprotective substances are known to affect the activity of various enzymes [10] and membrane transport systems [6, 29, 30], and also to cause structural modifications of membrane lipids [13, 14] and cytoskeleton proteins [22]. As a result of structural and functional rearrangements of individual subcellular systems under the influence of cryoprotectants, the volume and shape of cells, as well as physical properties of plasma membranes that determine the mechanical stability and deformability of erythrocytes, can change. The relationship between physical properties of erythrocyte membranes and their geometric parameters is confirmed by the studies of various pathologies caused by a violated structure of proteins being the part of membrane-cytoskeleton complex, in particular the transformation of the discoid shape of erythrocytes and disorders in mechanoelastic properties of membrane could be such an example [15]. These changes can play an important role in survival of cells during cryopreservation, since mechanical stress is one of the factors of membrane damage during freeze-thawing.

Assuming that different cryoprotective efficiency of PEG-1500 and sucrose in regard to human erythrocytes is related to structural and functional modifications of various membrane components, the expected effect of these substances could be different in terms of the changes in external parameters of cells (propor-



клеток в процессе криоконсервирования, поскольку механический стресс является одним из факторов повреждения мембран при замораживании-отогреве.

Допуская, что разная криопротекторная эффективность ПЭГ-1500 и сахарозы в отношении эритроцитов человека связана с особенностями структурных и функциональных модификаций различных компонентов мембраны, можно ожидать, что влияние данных веществ поразному проявится в изменениях внешних параметров клеток (пропорций, размера и формы). Вместе с тем, особенности трансформации геометрических параметров клеток под влиянием ПЭГ-1500 и сахарозы могут быть обусловлены различиями физико-химических свойств растворов данных веществ. В таком случае уже геометрия клетки «накладывает отпечаток» на структурное состояние и функциональную активность мембранных компонентов, что, в конечном итоге, может определять их разную криопротекторную эффективность в отношении эритроцитов человека. Независимо от того, являются ли изменения геометрических параметров эритроцитов под влиянием ПЭГ-1500 и сахарозы причиной или следствием структурно-функциональных модификаций мембранных компонентов, именно они в конечном счете определяют особенности трансформации физических свойств мембран, которые важны для повышения стабильности клеток в процессе криоконсервирования. Показателем модификации физических свойств мембран клеток под влиянием ПЭГ-1500 и сахарозы может быть, в частности, изменение осмотической хрупкости эритроцитов.

В связи с этим целью исследования было изучение особенностей влияния ПЭГ-1500 и сахарозы на модификацию геометрических параметров эритроцитов человека и изменение осмотической хрупкости клеток с учетом экзоцеллюлярного механизма действия и разной криопротекторной эффективности исследуемых соединений в отношении данного типа клеток.

Материалы и методы

В работе использовали следующие реактивы: Tris, HEPES, сахароза («Sigma», США), ПЭГ-1500 («Fluka», США), NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, а также другие реактивы производства Украины и России (х.ч. или ос.ч.).

Объектом исследования служили эритроциты крови доноров, заготовленной с использованием глюкозо-цитратного раствора в Центре службы крови г. Харькова. Эритроциты осаждали центрифугированием при 1200g в течение 10 мин при комнатной температуре, удаляли плазму и лейкоцитарные компоненты крови. Затем к осажденным

клеткам (различиями в размерах, пропорциях, размере и форме). At the same time, the peculiarities of transformation of cell geometric parameters under the influence of PEG-1500 and sucrose can be caused by differences existing in physicochemical properties of solutions of these substances. In this case, the 'geometry' of the cell could affect the structural state and functional activity of membrane components, and, finally, can determine a cryoprotective efficiency of different substances expressed in regard to human erythrocytes. Whether the changes in geometric parameters of erythrocytes under the influence of PEG-1500 and sucrose are the cause or consequence of structural and functional modifications of membrane components, they definitely trigger the changes in physical properties of membranes, and therefore control the stability of cells during cryopreservation. Such an example of altered physical properties of cell membranes due to the effect of PEG-1500 and sucrose can be, in particular, a change in the osmotic fragility of erythrocytes.

In this connection, the research aim was to study the peculiarities of the PEG-1500 and sucrose effect on changes in geometric parameters of human erythrocytes and cell osmotic fragility, considering their common extracellular type of action and different cryoprotective effect realized for this cell type.

Materials and methods

The following reagents were used in the research: Tris, HEPES, sucrose (Sigma, USA), PEG-1500 (Fluka, USA), NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, and other reagents produced in Ukraine and Russia (of chemically pure or high quality grades).

The research object was the erythrocytes of donors' blood procured using a glucose-citrate solution at the Blood Service Center of Kharkiv. Erythrocytes were pelleted by centrifugation at 1200g for 10 min at room temperature, the plasma and leukocyte components of the blood were removed. Then, medium A (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) was added to the pelleted erythrocytes in a volume exceeded in 5–7 times the volume of the cell mass and washed from the plasma and white cell residues by 3-fold centrifugation in a similar mode.

The geometric parameters of cells were examined by the flow cytometry according to the distribution of cell subpopulations estimated by direct light scattering (FCS) values at 488 nm wavelength (argon laser) using FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, USA). Erythrocytes were incubated for 30 min at 37°C in the solutions of PEG-1500 and sucrose, based on medium A, thereafter the washed erythrocytes were diluted to a concentration of approximately 10⁷ cells/ml. Control samples of erythrocytes were incubated in a modified Ringer's glucose medium: 125 mM



эритроцитам добавляли среду А (150 мМ NaCl; 10 мМ Трис-НCl, рН 7,4) в объеме, 5–7-кратно превышающем объем клеточной массы, отмывали от остатков плазмы и белых клеток 3-кратным центрифугированием в аналогичном режиме.

Геометрические параметры клеток определяли методом проточной цитометрии по данным распределения клеточных субпопуляций на основе показателей прямого светорассеивания (FCS) при длине волны аргонового лазера 488 нм на приборе «FACS Calibur» («Becton Dickinson», США). Эритроциты инкубировали в течение 30 мин при 37°C в растворах ПЭГ-1500 и сахарозы, приготовленных на основе среды А, с разведением отмывых эритроцитов до концентрации примерно 10^7 кл/мл. Контрольные образцы эритроцитов инкубировали в модифицированной Рингер-глюкозной среде: 125 мМ NaCl; 5 мМ KCl; 1 мМ MgCl₂; 1 мМ CaCl₂; 32 мМ HEPES (рН 7,4); 5 мМ глюкозы. Перед измерением клеточные суспензии разводили в соответствующих растворах до концентрации 10^6 кл/мл. При каждом измерении просчитывали 20 000 событий. Экспериментальные данные обрабатывали с помощью программы «WinMDI 2.8» («Scripps Research Institute», США).

Индекс сферичности оценивали с использованием ранее описанных подходов [11], которые базируются на физическо-математической модели мембранного транспорта в гипотоническом растворе NaCl и методе малоуглового светорассеивания. Принцип оценки индекса сферичности основывается на определении отношения объема эритроцита сферической формы с конкретной площадью поверхности к объему реального эритроцита с той же самой площадью поверхности [11].

Для определения осмотической хрупкости методом малоуглового светорассеивания в измерительную ячейку, содержащую 3 мл раствора NaCl с концентрацией от 0,05 до 0,15 М, вносили определенное количество эритроцитной массы с учетом требований проведения измерений в линейном диапазоне калибровочной кривой [11]. В отличие от стандартного определения осмотической хрупкости, когда клетки суспендируются в серии гипотонических растворов NaCl [22], применение метода малоуглового светорассеивания позволяет избежать ошибок, связанных с дополнительными механическими нагрузками на клетки при центрифугировании, и существенно ускоряет процедуру определения процентного содержания клеток, сохраняющих целостность в заданном гипотоническом растворе. По данным малоуглового светорассеивания и калибровочной кривой определяли долю негемолизированных клеток, сохранивших целостность в гипотонических растворах NaCl, со значениями

NaCl; 5 мМ KCl; 1 мМ MgCl₂; 1 мМ CaCl₂; 32 мМ HEPES (рН 7,4); 5 мМ glucose. Before measurement, the cell suspensions were diluted in the corresponding solutions to a concentration of 10^6 cells/ml. At each measurement 20,000 events were counted. The experimental data were processed using the WinMDI 2.8 software (Scripps Research Institute, USA).

The sphericity index was estimated using the previously described approaches [7], which are based on the physical-mathematical model of membrane transport in hypotonic NaCl solutions and the technique of smallangle light scattering. The principle of estimating the sphericity index is based on determining the ratio of the volume of a spherical erythrocyte with a specific surface area to the volume of a real erythrocyte with the same surface area [7].

To determine the osmotic fragility by a small-angle light scattering, a certain amount of erythrocytes was introduced into a measuring cell filled with 3 ml of NaCl solution with a concentration ranging from 0.05 to 0.15 M, and considering the calibration curve linear range [7]. Unlike the standard determination of osmotic fragility, when cells are introduced into a series of hypotonic NaCl solutions [18], the application of small-angle light scattering avoids the errors associated with additional mechanical loads on the cells during centrifugation and significantly accelerates the procedure for determining the percentage of cells, surviving in a particular hypotonic solution. Using small-angle light scattering and the calibration curve we estimated the share of non-hemolysed cells that retained their integrity in hypotonic NaCl solutions with normalized osmotic pressure ranging from 0.3 to 1 (relative to the osmotic pressure of physiological solution). The index of osmotic fragility of erythrocytes was determined as the concentration of NaCl in a hypotonic medium, at which the hemolysis level in the suspension was 50%.

The shape of the erythrocytes was assessed using an inverted optical microscope Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Germany) with differential interference contrast, *i. e.* dividing a polarized light beam into two beams, which pass through a sample by different optical paths. The interference of the two light beams after recombination depends on optical path difference and allows to get three-dimensional image corresponding to the variation of optical density of the sample, thereat sharpening lines and edges. Evaluation of the samples was carried out in a drop of liquid at a 40-fold magnification.

Different concentrations of sucrose and PEG-1500 were used in the work, depending on the protocols of the experiments. The correspondences of molar and percent concentrations for PEG-1500 were 0.07 M (10%), 0.13 M (20%); in case of sucrose they were 0.29 M (10%), 0.5 M (17%), 0.58 M (20%) and 1 M (34%).



осмотического давления от 0,3 до 1 и относительно осмотического давления физиологического раствора. Индекс осмотической хрупкости эритроцитов определяли как концентрацию NaCl в гипотонической среде, при которой уровень гемолиза в суспензии составлял 50%.

Форму эритроцитов оценивали с помощью инвертированного оптического микроскопа «Axio Observer Z1» («Carl Zeiss», Германия) с дифференциально-интерференционным контрастированием, при котором поляризованный луч от источника света разделяется на два луча, проходящих через образец разными по длине оптическими путями. Впоследствии лучи интерферируют при слиянии, контрастируя линии и границы, что позволяет создать объемное рельефное изображение, соответствующее изменению оптической плотности образца. Оценку образцов выполняли в капле жидкости при 40-кратном увеличении.

В зависимости от постановки экспериментов в работе использовали разные концентрации сахарозы и ПЭГ-1500. Соотношения молярных и процентных концентраций растворов были следующими: ПЭГ-1500 – 0,07 М (10%) и 0,13 М (20%); сахароза – 0,5 М (17%) и 1 М (34%) М, а также 10% (0,29 М) и 20% (0,58 М).

Статистическую обработку результатов выполняли с использованием программного пакета «Statgraphics plus 2.1 for Windows» («Statistical Graphics Corp.», США). Данные представлены в виде $M \pm SE$ (среднее значение \pm стандартная ошибка). Статистическую значимость различий между экспериментальными группами оценивали с помощью множественного рангового теста Фишера по процедуре группировки выборок с наименьшей значимой разницей. В каждой серии проведено по шесть опытов.

Результаты и обсуждение

Изучение модификации геометрических параметров эритроцитов (размер, пропорция и форма) под влиянием криопротекторов может представлять значительный интерес для понимания механизмов стабилизации клеток в стрессовых условиях, поскольку изменение объема и формы клеток влияет на физические свойства мембран эритроцитов [19]. Введение гипертонических растворов экзоцеллюлярных криопротекторов в суспензию эритроцитов вызывает выход воды из клеток с последующим перераспределением ионов между вне- и внутриклеточной средой и сопровождается изменением объема клеток. Известно, что в норме эритроциты представлены различными субпопуляциями, демонстрирующими значительную вариабельность целого ряда параметров, в том

The results were statistically processed using the software Statgraphics plus 2.1 for Windows (Statistical Graphics Corp., USA). The data were presented as $M \pm SE$ (mean \pm standard error). Statistical significance of the differences between experimental groups was assessed using a multiple Fisher rank test according to grouping the samples with the least significant difference. Six experiments were carried out in each series.

Results and discussion

The study of the modification of geometric parameters of erythrocytes (size, proportions and shape) under the influence of cryoprotectants can be of strong interest for understanding the mechanisms of cell stabilization under stressful conditions, since the change in volume and shape of cells affects physical properties of erythrocyte membranes [15]. The introduction of hypertonic solutions of extracellular cryoprotectants into the suspension of erythrocytes causes water to escape from the cells, the process is followed by a redistribution of ions between the external and intracellular media and a change in the cell volume. It is known that normally erythrocytes are represented by different subpopulations showing significant variability in a number of parameters, including volume, surface area and deformability [3, 9, 19], therefore the same effect can be differently perceived by cells of different subpopulations. In addition, the cryoprotectants belonging to different classes of chemical compounds influence the transport processes in the membrane in different way [8, 25], which determines the osmotic behavior of the cells. Therefore, it is impossible to estimate in advance how much the cell volume will change in the presence of solutions of extracellular compounds, even if their osmotic pressure is the same. To evaluate the changes in characteristics of a large number of cells, the flow cytometry is the most suitable tool for analyzing the individual parameters of several thousand cells in a heterogeneous cell suspension during one measurement and obtaining an information on the cell size change due to a direct light scattering signal (in the direction of the laser beam). It should be taken into account, the larger is the size of the object, the higher are the light scattering values. Since the movement of liquid in the capillary makes the erythrocytes to rotate, and the detectors fix different projections of the disc [20], the distribution of erythrocytes in the histograms has two peaks, *i. e.* is bimodal. Geometric parameters can be estimated either in linear or logarithmic forms. Using the example of distribution of native cells incubated in Ringer's medium, it can be seen that in the logarithmic form of the analysis (Fig. 1B), the erythrocytes are clearly distributed within the two zones corresponding to the M1 and M3 markers, which reflect the transverse and frontal orientation of the discoid



числе объема, площади поверхности и деформируемости [8, 13, 23], поэтому одно и тоже воздействие может по-разному восприниматься клетками, относящимися к разным субпопуляциям. Кроме того, криопротекторы, принадлежащие к разным классам химических соединений, неодинаково влияют на транспортные процессы в мембране [12, 29], что определяет осмотическое поведение клеток. Поэтому заранее невозможно оценить, насколько изменится объем клеток в присутствии растворов экзоцеллюлярных соединений, даже если их осмотическое давление будет одинаковым. Для оценки изменений характеристик большого числа клеток более всего подходит метод проточной цитометрии, позволяющий анализировать индивидуальные параметры нескольких тысяч клеток в гетерогенной клеточной суспензии при одном измерении и получать информацию об изменении размера клеток по сигналу прямого светорассеивания (в направлении лазерного луча). При этом следует учитывать, чем больше размер объекта, тем выше значения светорассеивания. Поскольку движение жидкости в капилляре заставляет эритроциты вращаться, и детекторы фиксируют разные проекции диска [24], то распределение эритроцитов на гистограммах имеет два пика, т. е. является бимодальным. Геометрические параметры могут оцениваться в линейной или логарифмической формах. На примере распределения нативных клеток, инкубированных в среде Рингера, можно видеть, что при логарифмической форме анализа (рис. 1, В) эритроциты четко распределяются в пределах двух зон, соответствующих маркерам М1 и М3, которые отражают поперечную и фронтальную ориентацию дисковидных клеток в потоке, в отличие от линейного типа анализа данных, для которого характерно перекрытие пиков гистограмм (рис. 1, А). Таким образом, логарифмическая форма позволяет более четко оценивать изменения размеров эритроцитов в поперечной (М1) и продольной (М3) проекциях.

Модификация геометрических параметров эритроцитов под влиянием ПЭГ-1500 и сахарозы характеризуется двумя параметрами: количеством клеток в каждой зоне, границы которых установлены на основании распределения клеток в контрольной среде, и значением медианы гистограммы распределения, показывающей величину, относительно которой клетки в выделенной зоне разделены на две равные по количеству части. Медиана гистограммы в каждой зоне объективно характеризует изменение размера клеток, представленного широким диапазоном значений. Изменения, индуцированные ПЭГ-1500 и сахарозой, являются концентрационно-зависимыми и характеризуются уменьшением количества клеток в зонах М1 и М3

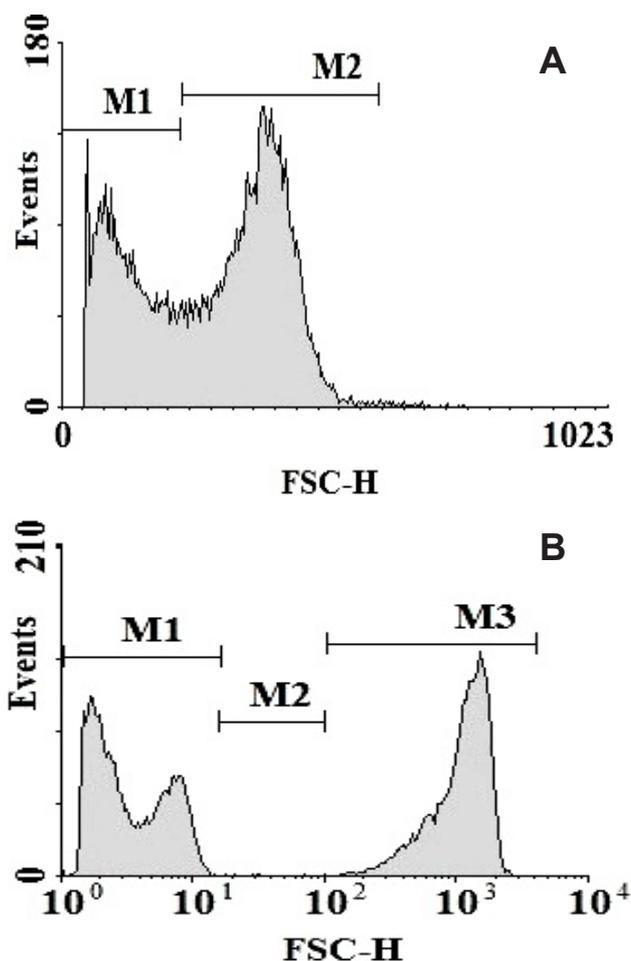


Рис. 1. Распределение популяций эритроцитов, инкубированных в среде Рингера (контроль), между зонами М1–М3 по данным прямого светорассеивания (FSC) проточной цитометрии в линейном (А) и логарифмическом виде (В). Ось X – показания прямого светорассеивания (усл. ед.), ось Y – результаты подсчета клеток с определенными геометрическими признаками. Представлены данные типичного эксперимента.

Fig. 1. Distribution of populations of erythrocytes incubated in Ringer's medium (control), between M1–M3 zones according to direct light scattering (FSC) of flow cytometry in linear (A) and logometric forms (B). The X axis is direct light scattering readings (arbitrary units), the Y axis – results of counting cells with certain geometric features. The data of a typical experiment are presented.

cells in the flow, in contrast to the linear type of data analysis, which is characterized by overlapping peaks of histograms (Fig. 1A). Thus, the logarithmic form makes it possible to more accurately estimate the changes in the size of erythrocytes in the transverse (M1) and longitudinal (M3) projections.

The modification of geometric parameters of erythrocytes under the influence of PEG-1500 and sucrose is characterized by two parameters: the number of cells in each zone whose margins are established on the basis of the distribution of cells in the control medium and the median of the distribution histogram

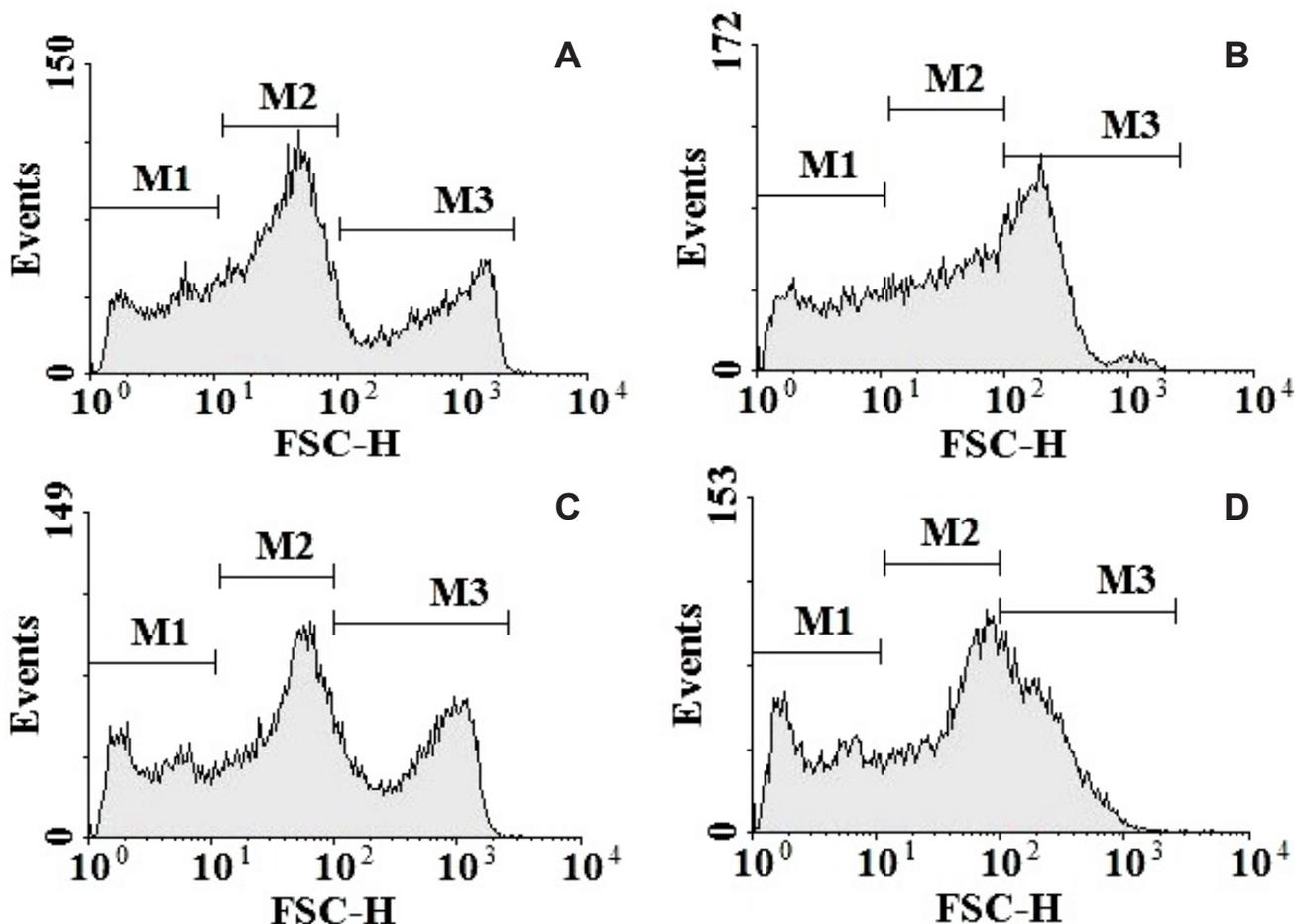


Рис. 2. Изменение геометрических параметров эритроцитов по данным прямого светорассеяния (FSC) проточной цитометрии под влиянием растворов сахарозы (5% (A), 20% (B)) и ПЭГ-1500 (5% (C) и 20% (D)). Распределение популяций контрольных эритроцитов, экспонированные в среде Рингера, представлено на рис. 1, В. Ось X – показания прямого светорассеяния (усл. ед.), ось Y – результаты подсчета клеток с определенными геометрическими признаками. Представлены данные типичного эксперимента.

Fig. 2. Change in geometric parameters of erythrocytes according to direct light scattering (FSC) of flow cytometry under the influence of solutions of sucrose (5% (A) and 20% (B)) and PEG-1500 (5% (C) and 20% (D)). Distribution of control erythrocyte populations incubated in Ringer's medium is shown in Fig. 1B. Axis X – indications of direct light scattering (arb. units), axis Y – results of counting cells with certain geometric features. The data of a typical experiment are presented.

с одновременным увеличением их доли в зоне M2 (табл. 1, рис. 2). Такая тенденция свидетельствует об отклонении геометрических пропорций значительного числа клеток от исходной дискоидной формы в направлении уменьшения фронтальных размеров (сдвиг из зоны M3 в зону M2), что связано с уменьшением объема клеток, а также в направлении увеличения поперечных размеров диска (сдвиг из зоны M1 в зону M2), что возможно за счет образования стоматоцито- и эхиноцитоподобных форм или сферификации. Анализ изменений геометрических параметров по значениям медиан в зоне M3 указывает на то, что при равных массовых долях двух криопротекторных агентов сахара вызывает более выраженное уменьшение фронтальных размеров эритроцитов, чем ПЭГ-1500 (табл. 1), что свидетельствует о большей степени

showing the value relative to which the cells in the selected zone are divided into two parts equal in number of objects. The median of the histogram in each zone objectively characterizes the changes in cell size within a wide range of values. The alterations induced by PEG-1500 and sucrose are concentration-dependent and evidenced by a decrease in the number of cells in the M1 and M3 zones with a simultaneous increase in the M2 zone (Table 1, Fig. 2). This trend indicates the deviance of the geometric proportions of a significant number of cells from the original discoid shape towards decreased frontal dimensions (a shift from M3 to M2 zone), which is associated with a decrease in the cell volume, and also to the increased transverse dimensions of the disc (shift from M1 to M2 zone), which is possible due to the formation of stomatocyte- and echinocyte-like forms or spherification. Analysis of changes in



Таблица 1. Перераспределение эритроцитов по размерам под влиянием ПЭГ-1500 и сахарозы в соответствии с показателями прямого светорассеивания (FSC) проточной цитометрии ($M \pm SE$)

Table 1. Redistribution of erythrocytes in size under influence of PEG-1500 and sucrose according to direct light scattering (FSC) of the flow cytometry ($M \pm SE$)

Среды Media	Количество клеток, % Cell number, %			Значения медиан гистограмм, усл. ед. Values of histogram medians, arb. units		
	M1	M2	M3	M1	M2	M3
Среда Рингера Ringer solution	53,8 ± 2,8	2,5 ± 0,6	43,8 ± 3,1	4,1 ± 0,5	–	1323,5 ± 44,4
Сахароза, 5% Sucrose, 5%	32,7 ± 2,9*	45,2 ± 2,3*	22,8 ± 2,3*	5,0 ± 0,4	63,3 ± 4,4	838,0 ± 96,6*
Сахароза, 20% Sucrose, 20%	37,3 ± 2,0*	46,4 ± 1,4*	17,23 ± 1,4*.#	4,3 ± 0,3	81,7 ± 3,8	289,8 ± 13,1*.#
ПЭГ-1500, 5% PEG-1500, 5%	36,2 ± 2,8*	43,3 ± 1,5*	21,1 ± 2,1*	4,8 ± 0,1	54,0 ± 2,7	977,2 ± 65,1*
ПЭГ-1500, 20% PEG-1500, 20%	41,2 ± 3,5*	46,0 ± 2,1*	13,6 ± 2,0*.#	4,3 ± 0,2	72,0 ± 5,0	365,6 ± 46,7*.#

Примечание: Зоны M1–M3 соответствуют маркерам гистограмм на рис. 2; * – отличия статистически значимы относительно контроля, # – отличия статистически значимы при сравнении 20%-х растворов сахарозы и ПЭГ-1500; $p < 0,05$.

Note: Zones M1–M3 correspond to the histogram markers in Fig. 2; * – the differences are statistically significant in regard to control, # – differences are statistically significant when comparing 20% solutions of sucrose and PEG-1500, $p < 0.05$.

дегидратации клеток под влиянием сахарозы. Особенно четко данные различия выражены при увеличении концентрации криопротекторов до 20%. Возможно, значительное обезвоживание эритроцитов в присутствии высоких концентраций сахарозы является одной из причин повышения их чувствительности к стрессовым воздействиям, что обуславливает меньшую, по сравнению с ПЭГ-1500, ее криопротекторную эффективность в отношении эритроцитов человека.

Для оценки роли осмотического фактора в модификации формы эритроцитов использовали 0,5 и 1 М растворы сахарозы, а также 0,07 и 0,13 М ПЭГ-1500, исходя из того, что растворы 0,13 М ПЭГ-1500 и 0,5 М сахарозы имеют близкие значения осмотического давления [20, 25]. Установлено, что инкубирование эритроцитов в присутствии ПЭГ-1500 (рис. 3, В, С) и сахарозы (рис. 3, D, E) характеризуется разной направленностью трансформации их формы. Основная тенденция модификации формы клеток в присутствии ПЭГ-1500 связана с формированием стоматоцитов, преобладание которых особенно заметно в присутствии 0,13 М ПЭГ-1500. Инкубирование эритроцитов с 0,5 М раствором сахарозы не вызывает значительных изменений формы, а повышение ее концентрации до 1 М приводит к доминированию дегидратированных уплощенных дисков. Данный факт свидетельствует о том, что осмотический фактор не является основным в модификации формы эритроцитов, а зависит от особенностей структурного состояния мембраны, которое, в свою очередь, определяется физико-

geometric parameters based on median values in the M3 zone indicates that, even at equal mass content of two cryoprotective agents, sucrose causes a more pronounced decrease in the frontal sizes of erythrocytes than PEG-1500 (Table 1), which demonstrates a higher dehydration of cells under the influence of sucrose. These differences are very clearly expressed when the concentration of cryoprotectants is increased up to 20%. Significant dehydration of erythrocytes in the presence of high sucrose concentrations is apparently one of the reasons for increasing their sensitivity to stress, which results in a lower cryoprotective efficiency towards human erythrocytes compared to PEG-1500.

To assess the role of osmotic factor in modification of erythrocyte shape, we have used 0.5 and 1 M sucrose solutions, as well as 0.07 and 0.13 M PEG-1500, considering the fact that solutions of 0.13 M PEG-1500 and 0.5 M sucrose have similar values of osmolarity [16, 21]. It has been established that the incubation of erythrocytes in the presence of PEG-1500 (Fig. 3B, C) and sucrose (Fig. 3D, E) is characterized by different trends in the shape transformation. The main consistent pattern in modification of the cell shape in the presence of PEG-1500 is associated with the formation of stomatocytes, predominance of those is particularly noticeable in the presence of 0.13 M PEG-1500. Incubation of erythrocytes with 0.5 M sucrose does not lead to significant changes in the shape, but increasing its concentration up to 1 M results in the dominance of dehydrated flattened discs. This fact indicates that the osmotic factor is not the main one in modification of

химическими свойствами растворов криопротекторных агентов.

Известно, что изменения формы эритроцитов могут быть обусловлены модификациями липидного бислоя и структурного состояния белков цитоскелетной сети. В частности, в соответствии с гипотезой бислойной пары [6] трансформация дискоцитов в стоматоциты может быть связана с расширением внутреннего монослоя относительно внешнего или с уменьшением площади поверхности внешнего мембранного монослоя относительно внутреннего. Кроме того, данной гипотезой объясняется также появление стоматоцитоподобных форм с двумя полостями и треугольных стоматоцитов. Роль белков мембрано-цитоскелетного комплекса [19] в процессах модификации формы эритроцитов подтверждается в частности тем, что для трансформации эритроцитов в эхиноциты или стоматоциты и обратимости данных изменений необходимо, чтобы цитоскелет эритроцитов находился в интактном состоянии. Кроме того, появление некоторых форм эритроцитов с неосевой симметрией, характеризующихся образованием отдельных выпячиваний и гребней на поверхности клеток, может быть обусловлено локальными изменениями белковой сети цитоскелета.

Модификации формы эритроцитов в присутствии исследуемых криопротекторов могут свидетельствовать о разном характере влияния сахарозы и ПЭГ-1500 на клеточную мембрану. Очевидно, что действие ПЭГ-1500 на эритроциты связано не только с осмотическим эффектом, но и с влиянием на структурно-функциональное состояние отдельных элементов мембрано-цитоскелетного комплекса, которые прямо или опосредованно влияют на трансформацию формы [2, 30]. Прежде всего необходимо отметить, что в отличие от сахарозы ПЭГ-1500 тормозит активность Ca^{2+} -АТФазы [3, 5] и способствует росту концентрации внутриклеточного Ca^{2+} [15], который участвует в регуляции белок-белковых взаимодействий в мембрано-цитоскелетном комплексе и, следовательно, может влиять на форму клеток. Преобладание стоматоцитов в суспензии клеток, инкубированных в присутствии ПЭГ, может свидетельствовать об уменьшении площади поверхности внешнего мембранного монослоя относительно внутреннего под влиянием структурных изменений макромолекул в присутствии высоких концентраций полимера. Таким образом, модификация формы эритроцитов под влиянием ПЭГ-1500 может быть результатом сложных процессов в мембрано-цитоскелетном комплексе.

Дополнительную информацию об изменении геометрических пропорций эритроцитов под влия-

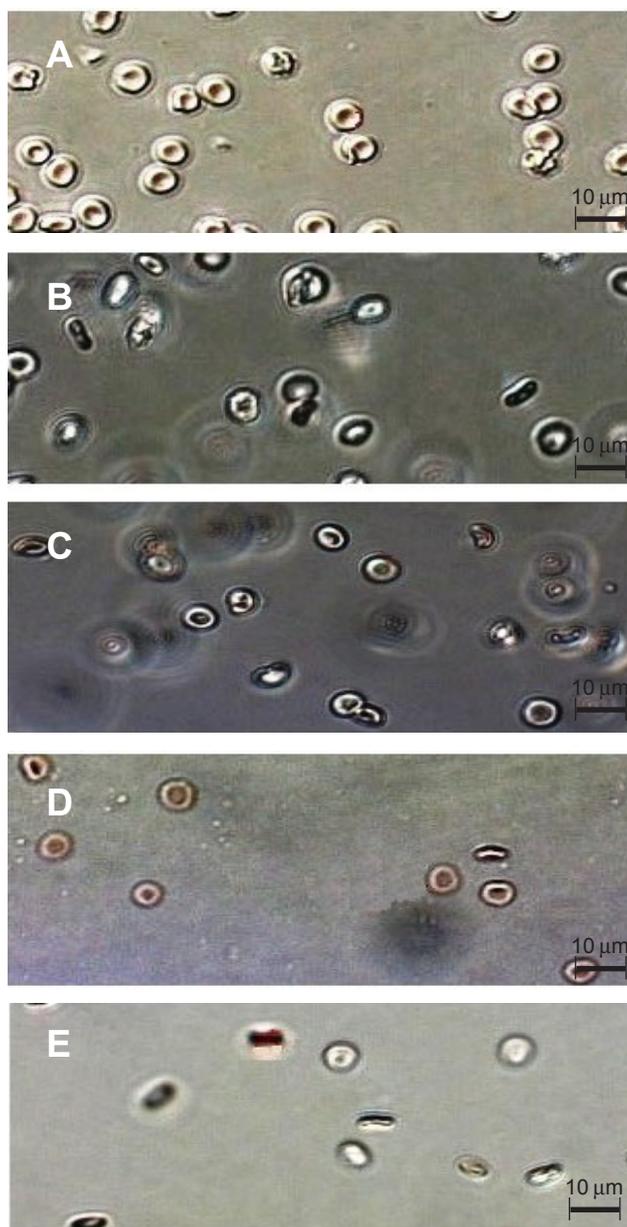


Рис. 3. Морфологические изменения эритроцитов под влиянием ПЭГ-1500 (**В** – 0,07 М; **С** – 0,13 М) и сахарозы (**Д** – 0,5 М; **Е** – 1 М); **А** – контроль (среда Рингера).

Fig. 3. Morphological changes of erythrocytes under influence of PEG-1500 (**B** – 0.07 M; **C** – 0.13 M) and sucrose (**D** – 0.5 M; **E** – 1 M); **A** – control (Ringer's medium).

erythrocyte shape, but depends on the features of structural state of membrane, which, in turn, is determined by physicochemical properties of solutions of cryoprotective agents.

It is known that changes in the erythrocyte shape can occur due to modifications of the lipid bilayer and structural state of proteins of cytoskeleton network. In particular, according to the hypothesis of the bilayer couple [2], the transformation of discocytes into stomatocytes can be associated with the expansion of the inner monolayer while the outer one is not changed, or



Таблица 2. Распределение эритроцитов по индексу сферичности при экспонировании в присутствии ПЭГ-1500 и сахарозы

Table 2. Distribution of erythrocytes incubated in the presence of PEG-1500 and sucrose, according to the sphericity index

Диапазон индекса сферичности Range of sphericity index	Теоретически определяемая форма эритроцитов Theoretically determined shape of erythrocytes	Относительное содержание эритроцитов, % Relative content of erythrocytes, %		
		NaCl 0,150 M 0.150 M NaCl	ПЭГ 20% 20% PEG	Сахароза 0,5 M 0.5 M Sucrose
1,0 – 1,3	Сфероциты + стоматоциты Spherocytes + stomatocytes	3,33 ± 0,96	4,67 ± 0,61	2,36 ± 2,36
1,3 – 1,7	Дискоциты Discocytes	33,43 ± 4,42	52,43 ± 2,61 *	37,97 ± 9,17
1,7 – 2,1	Дискоциты + уплощенные клетки Discocytes + flattened cells	58,47 ± 6,60	39,93 ± 2,98 *	54,17 ± 6,17
2,1 – 3,0	Плоские дискоциты Flat discocytes	4,77 ± 1,88	3,17 ± 1,17	5,5 ± 1,42

Примечание: * – различия статистически значимы относительно контроля и эритроцитов, экспонированных в присутствии сахарозы; $p < 0,05$.

Note: * – the differences are statistically significant with respect to control and erythrocytes incubated in the presence of sucrose; $p < 0,05$.

нием гипертонических растворов ПЭГ-1500 и сахарозы можно получить по индексу сферичности клеток (табл. 2), используя физико-математическую модель, описывающую осмотическое поведение эритроцитов разной формы в гипотонических растворах [11]. Данный геометрический параметр количественно характеризует отклонение формы эритроцита от сферической и определяется теоретически как отношение объема сферического эритроцита с постоянной площадью поверхности к объему конкретного эритроцита в суспензии. Клетки в форме диска имеют объем, максимально отличающийся от сферы, следовательно, индекс сферичности для таких клеток является максимальным. По мере трансформации клеток в сфероциты индекс сферичности приближается к единице.

Представленные данные (табл. 2, рис. 4) показывают, что реакции эритроцитов, инкубированных в растворах ПЭГ-1500 и сахарозы с близкими значениями осмотического давления, при переносе в гипотонические растворы, используемые для оценки индекса сферичности, отличаются. В растворе ПЭГ-1500 доля клеток с индексом сферичности в диапазоне 1,7–2,1 значимо ниже, а в диапазоне 1,3–1,7 значимо выше относительно как контроля, так и клеток, инкубированных в растворе сахарозы. Таким образом, при инкубировании эритроцитов с ПЭГ-1500 отмечается сдвиг плотности распределения клеток в сторону сферических форм. Поскольку данные теоретические расчеты проведены на основе функциональных особенностей поведения клеток в гипотонической среде, т. е. имеют прогностический характер, то можно говорить ско-

with a decrease in the surface area of outer membrane monolayer with constant internal one. In addition, this hypothesis also explains the appearance of stomatocyte-like forms with two cavities and triangular stomatocytes. The role of proteins of the membrane-cytoskeleton complex [15] in the modification of erythrocyte shape is sustained, in particular, by the fact that for the transformation of erythrocytes into echinocytes or stomatocytes and the reversibility of these

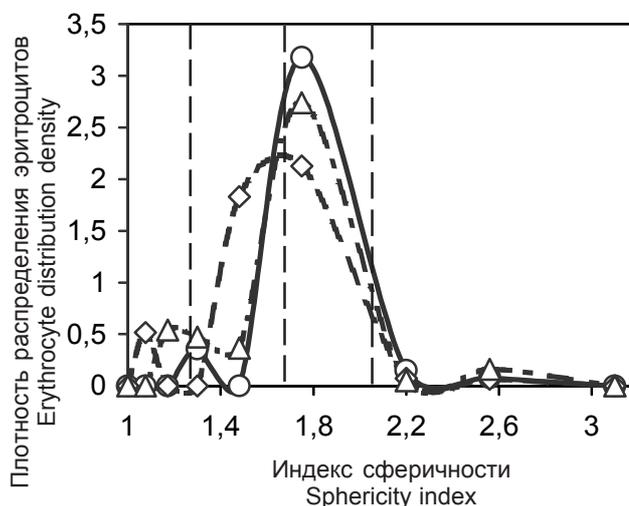


Рис. 4. Распределение популяций эритроцитов, экспонированных в растворах ПЭГ-1500 и сахарозы, по индексу сферичности: Δ – контрольная среда; \diamond – ПЭГ-1500 (0,13 M); \circ – сахароза (0,5 M). Представлены данные типичного эксперимента.

Fig. 4. Distribution of populations of erythrocytes incubated in solutions of PEG-1500 and sucrose, according to the sphericity index: Δ – control medium; \diamond – PEG-1500 (0.13 M); \circ – sucrose (0.5 M). The data of a typical experiment are presented.

рее о тенденции, в соответствии с которой эритроциты под влиянием ПЭГ-1500 приобретают свойства, характерные для клеток с признаками значительного изменения пропорций диска в направлении сферы. Тем не менее результаты расчетов, характеризующие изменение пропорций эритроцитов под влиянием ПЭГ-1500, согласуются с экспериментально установленными данными об изменениях формы клеток (см. рис. 3).

Изменения геометрических характеристик эритроцитов в присутствии ПЭГ-1500 и сахарозы могут влиять на механоэластические свойства мембраны, которые важны для выживания клеток в стрессовых условиях криоконсервирования, поскольку механический стресс может способствовать повреждению клеток при замораживании-отогреве. Для оценки изменений свойств мембран эритроцитов был использован тест осмотической хрупкости, который интегрально оценивает стабильность клеток на основе особенностей лизиса в гипотонических растворах. Как видно на рис. 5, эритроциты, предварительно инкубированные с ПЭГ-1500, характеризуются большей хрупкостью по сравнению с контрольными клетками и клетками, инкубированными в растворе 0,5 М сахарозы. Различия в модификации свойств мембран эритроцитов под влиянием данных экзоцеллюлярных соединений более четко демонстрирует индекс осмотической хрупкости, показывающий концентрацию NaCl в гипотонической среде, при которой гемолиз в суспензии достигает 50 % (рис. 6). Видно, что ПЭГ-1500

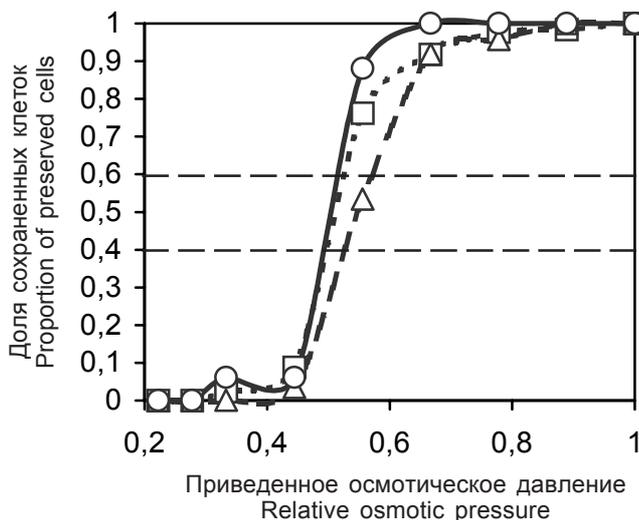


Рис. 5. Осмотическая хрупкость эритроцитов в растворах криопротекторных веществ: □ – контрольная среда; △ – ПЭГ-1500 (0,13 М); ○ – сахароза (0,5 М). Представлены данные типичного эксперимента.

Fig. 5. Osmotic fragility of erythrocytes in solutions of cryoprotective substances: □ – control medium; △ – PEG-1500 (0.13 M); ○ – sucrose (0.5 M). The data of a typical experiment are presented.

changes, the cytoskeleton of erythrocytes should be in an intact state. In addition, the appearance of some shapes of erythrocytes with non-axis symmetry, characterized by the formation of separate protrusions and crests on the cell surface, may be stipulated by local changes in the protein network of the cytoskeleton.

Modifications of the shape of erythrocytes in the presence of the examined cryoprotectants can indicate different patterns of the effects of sucrose and PEG-1500 on cell membrane. It is obvious that the effect of PEG-1500 on erythrocytes is associated not only with the osmotic effect, but also with the effect on structural-functional state of individual elements of the membrane-cytoskeleton complex that either directly or indirectly influences the transformation of the shape [26, 27]. First of all, it should be noted that in contrast to sucrose, PEG-1500 inhibits the activity of Ca^{2+} -ATPase [28, 30] and promotes an increase in the intracellular Ca^{2+} concentration [11], which is involved into regulation of protein-protein interactions within membrane-cytoskeleton complex and, consequently, can influence the shape of the cells. The predominance of stomatocytes in a suspension of cells incubated in the presence of PEG may indicate a decrease in the surface area of outer membrane monolayer in regard to the internal one under the influence of structural changes in macromolecules in the presence of high concentrations of the polymer. Thus, the modification of the shape of erythrocytes under the influence of PEG-1500 can be the result of complicated processes in the membrane-cytoskeletal complex.

Additional information on the change in geometric proportions of erythrocytes under the influence of hypertonic solutions of PEG-1500 and sucrose can be obtained from the sphericity index of cells (Table 2), calculated using physico-mathematical model on the osmotic behavior of erythrocytes with different shapes in hypotonic solutions [7]. This geometric parameter quantitatively characterizes the deviation of the erythrocyte shape from the spherical one and is theoretically defined as the ratio of the volume of spherical erythrocyte with the constant surface area to the volume of specific erythrocyte in the suspension. Disc-shaped cells have a volume that maximally differs from the sphere, hence, the sphericity index for these cells is the biggest. As the cells transform into spherocytes, the sphericity index approaches 1.

The presented data (Table 2, Fig. 4) show that the responses of the erythrocytes incubated in solutions of PEG-1500 and sucrose with similar osmotic pressure values are different, when transferred to hypotonic solutions used to estimate the sphericity index. In the PEG-1500 solution, the proportion of cells with a sphericity index within the range of 1.7–2.1 is significantly lower, and within the range of 1.3–1.7 it is

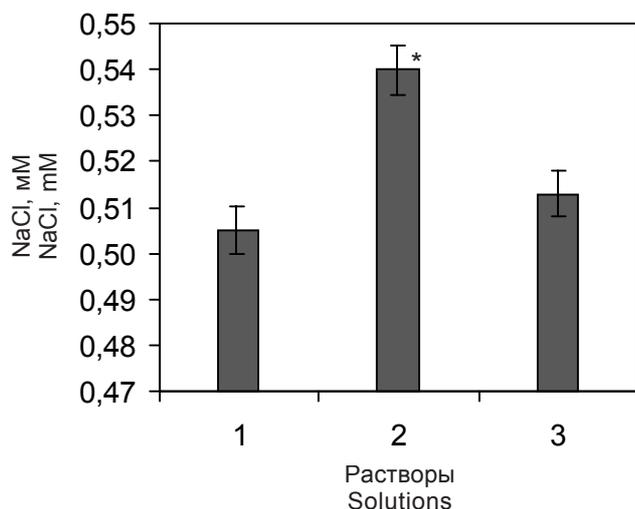


Рис. 6. Индекс осмотической хрупкости эритроцитов, инкубированных в растворах ПЭГ-1500 и сахарозы: 1 – 0,15 М NaCl; 2 – 0,13 М ПЭГ-1500; 3 – 0,5 М сахарозы; * – отличия статистически значимы относительно контроля и эритроцитов, инкубированных в присутствии сахарозы, $p < 0.05$.

Fig. 6. Index of osmotic fragility of erythrocytes, incubated in PEG-1500 and sucrose solutions: 1 – 0.15 M NaCl; 2 – 0.13 M PEG-1500; 3 – 0.5 M sucrose; * – differences are statistically significant in regard to control and erythrocytes, incubated in sucrose presence, $p < 0.05$.

повышает чувствительность эритроцитов к лизису в гипотонических растворах, в то время как сахароза не влияет на данный параметр.

Осмотическая хрупкость эритроцитов может зависеть от механоэластических и барьерно-транспортных свойств мембраны. Важно отметить, что механоэластические свойства мембран, определяющие механическую стабильность и деформируемость клеток, могут изменяться независимо друг от друга, поскольку контролируются различными белок-белковыми взаимодействиями [7]. Повышение механической устойчивости часто реализуется в виде увеличения жесткости мембраны, что позволяет клеткам выдерживать значительные по величине силовые воздействия без признаков гемолитических повреждений эритроцитов. Однако повышение жесткости мембраны нередко сопровождается снижением ее эластичности. Допуская, что структурно-функциональная модификация мембраны эритроцитов под влиянием ПЭГ-1500 проявляется такого рода изменениями механоэластических свойств, можно ожидать снижения способности мембран «оперативно» реагировать на необходимость эластического растяжения при увеличении объема клеток в гипотонической среде, что увеличивает осмотическую хрупкость. Кроме того, ПЭГ-1500 может тормозить активность ион-транспортных систем [3, 5, 10] и тем самым влиять

значительно выше относительно как контрольных, так и клеток, инкубированных в растворе сахарозы. Таким образом, когда эритроциты инкубируются с ПЭГ-1500, происходит сдвиг в распределении клеток в сторону сферических форм. Поскольку эти теоретические расчеты выполнялись с учетом поведения клеток в гипотонической среде, они носят прогнозный характер, и можно говорить о тенденции клеток под влиянием ПЭГ-1500 приобретать свойства, характерные для клеток с признаками значительного изменения диска в сторону сферы. Несмотря на это, результаты расчетов, характеризующие изменение пропорций эритроцитов под влиянием ПЭГ-1500, согласуются с экспериментально установленными данными об изменении формы клеток (см. Рис. 3).

Изменения геометрических характеристик эритроцитов в присутствии ПЭГ-1500 и сахарозы могут влиять на механоэластические свойства мембраны, которые важны для выживания клеток в условиях криопротекции, поскольку механический стресс может способствовать повреждению клеток при заморозке-оттаивании. Для оценки изменений свойств мембран эритроцитов использовался тест на осмотическую хрупкость, который дает интегрированные данные о стабильности клеток на основе лизиса в гипотонических растворах. Как видно из Рис. 5, эритроциты, предварительно инкубированные с ПЭГ-1500, более чувствительны к лизису в гипотонических растворах, чем контрольные клетки и клетки, инкубированные в 0,5 М растворе сахарозы. Различия в модификации свойств мембран эритроцитов под влиянием этих экстракционных соединений более наглядно продемонстрированы индексом осмотической хрупкости, который показывает концентрацию NaCl в гипотонической среде, при которой гемолитический лизис в суспензии достигает 50% (Рис. 6). Видно, что ПЭГ-1500 повышает чувствительность эритроцитов к лизису в гипотонических растворах, в то время как сахароза не влияет на данный параметр.

Осмотическая хрупкость эритроцитов может зависеть от механоэластических и барьерно-транспортных свойств мембраны. Важно отметить, что механоэластические свойства мембран, определяющие механическую стабильность и деформируемость клеток, могут изменяться независимо друг от друга, поскольку контролируются различными белок-белковыми взаимодействиями [4]. Повышение механической устойчивости часто реализуется в виде увеличения жесткости мембраны, что позволяет клеткам выдерживать значительные по величине силовые воздействия без признаков гемолитических повреждений эритроцитов. Однако повышение жесткости мембраны нередко сопровождается снижением ее эластичности. Допуская, что структурно-функциональная модификация мембраны эритроцитов под влиянием ПЭГ-1500 проявляется такого рода изменениями механоэластических свойств, можно ожидать снижения способности мембран «оперативно» реагировать на необходимость эластического растяжения при увеличении объема клеток в гипотонической среде, что увеличивает осмотическую хрупкость. Кроме того, ПЭГ-1500 может тормозить активность ион-транспортных систем [3, 5, 10] и тем самым влиять

на осмотические реакции клеток. Изменение способности эритроцитов в присутствии ПЭГ-1500 реагировать на быструю смену осмотического давления внешней среды посредством «оперативного» контроля транспортных потоков ионов через мембрану также может быть причиной повышения осмотической хрупкости.

Таким образом, экзоцеллюлярные вещества, ПЭГ-1500 и сахаразы, отличающиеся криопротекторными свойствами в отношении эритроцитов человека, вызывают неодинаковые изменения геометрических параметров клеток (пропорции, размер и форма), что указывает на различия в модификации структуры и функциональной активности отдельных компонентов мембраны. Несхожесть внешних проявлений ответа эритроцитов на гипертонические растворы ПЭГ-1500 и сахаразы сопровождается также разной модификацией физических (механоэластических и барьернотранспортных) свойств мембраны, о чем свидетельствует повышение индекса осмотической хрупкости эритроцитов под влиянием ПЭГ-1500. Представленные данные подтверждают тот факт, что защитные свойства экзоцеллюлярных веществ, в частности ПЭГ-1500 и сахаразы, определяются не только их способностью изменять характер кристаллизации растворов в процессе замораживания-отогрева, но и особенностями модификации структурно-функциональных свойств мембраны, обусловленных присутствием данных веществ во внеклеточной среде.

Выводы

1. Инкубирование эритроцитов в гипертонических растворах ПЭГ-1500 и сахаразы вызывает перераспределение эритроцитов по показателям прямого светорассеивания (FSC) проточной цитометрии, что свидетельствует об отклонении формы значительного количества клеток от исходной дискоидной формы в направлении уменьшения фронтальных и увеличения поперечных размеров диска. Данные изменения в большей степени выражены в присутствии сахаразы, что указывает на большую степень дегидратации клеток при равных массовых долях двух криопротекторов.

2. Модификация формы эритроцитов под влиянием ПЭГ-1500 характеризуется тенденцией к формированию стоматоцитов, в то время как инкубирование в растворах сахаразы способствует образованию уплощенных дегидратированных дисков.

3. Значение индекса сферичности эритроцитов в изученных растворах указывает на сдвиг плотности распределения клеток в сторону сферических типов клеток при инкубировании с ПЭГ-1500 в

to the need for elastic stretching with an increase in the cell volume in hypotonic medium, *i. e.* the osmotic fragility is augmented in this case. In addition, PEG-1500 can inhibit the activity of ion transport systems [6, 28, 30] and thereby influence the osmotic reactions of cells. The change in the ability of erythrocytes in the presence of PEG-1500 to react to a rapid change in the osmotic pressure of external environment by means of an appropriate control of the transport flow of ions through the membrane can also be the cause of an increase in osmotic fragility.

Thus, extracellular substances, PEG-1500 and sucrose, distinguished by cryoprotective properties in regard to human erythrocytes, cause unequal changes in geometrical parameters of cells (proportions, size and shape), which indicates differences in modification of the structure and functional activity of individual membrane components. The non-similarity of external manifestations in the response of erythrocytes to hypertonic solutions of PEG-1500 and sucrose is also accompanied by a different modification of physical (mechanoelastic and barrier-transport) properties of membrane, as evidenced by a rise in the osmotic fragility index of erythrocytes under the influence of PEG-1500. The presented data substantiate the fact that the protective properties of extracellular substances, in particular PEG-1500 and sucrose, are determined not only by their ability to change the crystallization character of solutions during the freeze-thawing, but also by the features of the modification of structural-functional properties of membrane, due to the presence of these substances in extracellular environment.

Conclusions

1. Incubation of erythrocytes in hypertonic solutions of PEG-1500 and sucrose caused a redistribution of erythrocytes according to direct light scattering (FSC) parameters of flow cytometry, which indicated the deviance of a significant amount of cells from the original discoid shape towards the decrease in frontal and increase in transverse dimensions of the disc. These changes were more pronounced in the presence of sucrose, that indicated a higher dehydration of cells at equal mass fractions of the two cryoprotectants.

2. Modification of the erythrocyte shape under the influence of PEG-1500 was characterized by a tendency to the stomatocyte accomplishment, while incubation in the sucrose solutions promoted the formation of flattened dehydrated discs.

3. The erythrocyte sphericity index in the examined solutions indicated a shift in the density of cell distribution toward spherical cell types when incubated with PEG-1500 in contrast to sucrose, the presence of which in the medium did not cause significant changes in this parameter.



отличие от сахарозы, присутствие которой в среде не вызывает значимых изменений данного параметра.

4. Изменения геометрической пропорции эритроцитов под влиянием ПЭГ-1500 отражаются на физических свойствах мембраны и характеризуются большей осмотической хрупкостью относительно контрольных клеток и клеток, инкубированных в присутствии сахарозы.

Литература

1. Бабийчук Л.А., Землянских Н.Г. Оптимизация и преимущества безотмывочного метода криоконсервирования эритроцитов с ПЭО-1500 // Проблемы криобиологии. – 2001. – №1. – С. 35–44.
2. Землянских Н.Г. Влияние веществ, обладающих криопротекторными свойствами, на поверхностный маркер CD44 эритроцитов человека // Цитология и генетика. – 2016. – Т. 50, №3. – С. 60–79.
3. Землянских Н.Г., Бабийчук Л.А. Изменения активности Ca²⁺-АТФазы эритроцитов под влиянием ПЭГ-1500 и низких температур // Цитология. – 2016. – Т. 58, №12. – С. 964–970.
4. Землянских Н.Г., Кофанова О.А. Модификация активности Ca²⁺-АТФазы эритроцитов человека под влиянием глицерола: роль кальмодулина // Биохимия. – 2006. – Т. 71, №8. – С. 1112–1118.
5. Землянских Н.Г., Хоменко М.В. Активность Ca²⁺-АТФазы эритроцитов человека в гипертонических средах при низкой и физиологической температуре // Биол. мембраны. – 2006. – Т. 23, №6. – С. 484–492.
6. Bess M. Red cell shapes: an illustrated classification and its rational // *Nouv. Rev. Fr. Hemat.* – 1972. – Vol. 12, №6. – P. 721–745.
7. Chasis J.A., Mohandas N. Erythrocyte membrane deformability and stability: two distinct membrane properties that are independently regulated by skeletal protein associations // *J. Cell. Biol.* – 1986. – Vol. 103, №2 – P. 343–350.
8. Dobbe J.G., Streekstra G.J., Hardeman M.R. et al. Measurement of the distribution of red blood cell deformability using an automated rheoscope // *Cytometry.* – 2002. – Vol. 50, №6. – P. 313–325.
9. El-Shewy H.M., Kendall W.F.Jr., Darrabie M. et al. Polyvinyl pyrrolidone: a novel cryoprotectant in islet cell cryopreservation // *Cell Transplant.* – 2004. – Vol. 13, №3. – P. 237–243.
10. Esmann M., Fedosova N.U., Marsh D. Osmotic stress and viscous retardation of the Na,K-ATPase ion pump // *Biophys. J.* – 2008. – Vol. 94, №7. – P. 2767–2776.
11. Gordienko O.I., Gordienko Yu.E., Makedonska V.I. Estimation of erythrocyte population state by the spherical index distribution // *Bioelectrochemistry.* – 2004. – Vol. 62, №2 – P. 119–122.
12. Heinzinger H., van den Boom F., Tinel H. et al. In rat hepatocytes, the hypertonic activation of Na⁺ conductance and Na⁺-K⁺-2Cl⁻-symport – but not Na⁺-H⁺ antiport – is mediated by protein kinase C // *J. Physiol.* – 2001. – Vol. 536, Pt. 3. – P. 703–715.
13. Higgins J.M. Red blood cell population dynamics // *Clin. Lab. Med.* – 2015. – Vol. 35, №1. – P. 43–57.
14. Huang X., Feng G., Zhao F. et al. Effects of vitrification protocol on the lactate dehydrogenase and total atpase activities of chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* embryos // *Cryo-Letters.* – 2016. – Vol. 37, №3. – P. 142–153.
15. Kucherenko Y.V., Bernhardt I. The study of Ca²⁺ influx in human erythrocytes in isotonic polyethylene (glycol) 1500

4. Changes in geometric proportions of erythrocytes under the influence of PEG-1500 affected physical properties of membrane and were manifested in higher osmotic fragility relative to the control cells and the ones incubated in the sucrose presence.

References

1. Babijchuk L.A., Zemlianskykh N.G. Optimization and advantages of washing-out method of erythrocyte cryopreservation with PEO-1500. *Probl Cryobiol* 2001; (1): 35–44.
2. Bess M. Red cell shapes: an illustrated classification and its rational. *Nouv Rev Fr Hemat* 1972; 12(6): 721–745.
3. Dobbe J.G., Streekstra G.J., Hardeman M.R. et al. Measurement of the distribution of red blood cell deformability using an automated rheoscope. *Cytometry* 2002; 50(6): 313–325.
4. Chasis J.A., Mohandas N. Erythrocyte membrane deformability and stability: two distinct membrane properties that are independently regulated by skeletal protein associations. *J Cell Biol* 1986; 103(2): 343–350.
5. El-Shewy H.M., Kendall W.F.Jr., Darrabie M. et al. Polyvinyl pyrrolidone: a novel cryoprotectant in islet cell cryopreservation. *Cell Transplant* 2004; 13(3): 237–243.
6. Esmann M., Fedosova N.U., Marsh D. Osmotic stress and viscous retardation of the Na,K ATPase ion pump. *Biophys J* 2008; 94(7): 2767–2776.
7. Gordienko O.I., Gordienko Yu.E., Makedonska V.I. Estimation of erythrocyte population state by the spherical index distribution. *Bioelectrochemistry* 2004; 62(2): 119–122
8. Heinzinger H., van den Boom F., Tinel H. et al. In rat hepatocytes, the hypertonic activation of Na⁺ conductance and Na⁺-K⁺-2Cl⁻-symport – but not Na⁺-H⁺ antiport – is mediated by protein kinase C. *J Physiol* 2001; 536(3): 703–715.
9. Higgins J.M. Red blood cell population dynamics. *Clin Lab Med* 2015; 35(1): 43–57.
10. Huang X., Feng G., Zhao F. et al. Effects of vitrification protocol on the lactate dehydrogenase and total atpase activities of chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* embryos. *CryoLetters* 2016; 37(3): 142–153.
11. Kucherenko Y.V., Bernhardt I. The study of Ca²⁺ influx in human erythrocytes in isotonic polyethylene (glycol) 1500 and sucrose media. *Ukr Biokhim Zh* 2006; 78(6): 46–52.
12. Lee Y.A., Kim Y.H., Ha S.J. et al. Effect of sugar molecules on the cryopreservation of mouse spermatogonial stem cells. *Fertil Steril* 2014; 101(4): 1165–1175.
13. Lehtonen J.Y., Kinnunen P.K. Poly(ethylene glycol)-induced and temperature-dependent phase separation in fluid binary phospholipid membranes. *Biophys J* 1995; 68(2): 525–535.
14. Malajczuk C.J., Hughes Z.E., Mancera R.L. Molecular dynamics simulations of the interactions of DMSO, mono- and polyhydroxylated cryosolvents with a hydrated phospholipid bilayer. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1828(9): 2041–2055.
15. Mohandas N., Chasis J.A. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin Hematol* 1993; 30(3): 171–192.
16. Money N.P. Osmotic pressure of aqueous polyethylene glycols. *Plant Physiol* 1989; 91(2): 766–769.
17. Pallotta V., D'Amici G.M., D'Alessandro A. et al. Red blood cell processing for cryopreservation: from fresh blood to deglycerolization. *Blood Cells Mol Dis* 2012; 48(4): 226–232.
18. Parpart A., Lorenz P.B., Parpart E.R. et al. The Osmotic Resistance (Fragility) of Human Red Cells. *J Clin Invest* 1947; 26(4): 636–640
19. Patel K.V., Mohanty J.G., Kanapuru B. et al. Association of the red cell distribution width with red blood cell deformability. *Adv Exp Med Biol* 2013; (765): 211–216.



- (PEG-1500) and sucrose media // Ukr. Biokhim. Zh. – 2006. – Vol. 78, №6. – P.467-52.
16. Lee Y.A., Kim Y.H., Ha S.J. et al. Effect of sugar molecules on the cryopreservation of mouse spermatogonial stem cells // *Fertil. Steril.* – 2014. – Vol. 101, №4. – P. 1165–1175.
 17. Lehtonen J.Y., Kinnunen P.K. Poly(ethylene glycol)-induced and temperature – dependent phase separation in fluid binary phospholipid membranes // *Biophys. J.* – 1995. – Vol. 68, №2. – P. 525–535.
 18. Malajczuk C.J., Hughes Z.E., Mancera R.L. Molecular dynamics simulations of the interactions of DMSO, mono- and polyhydroxylated cryosolvents with a hydrated phospholipid bilayer // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – Vol. 1828, №9. – P. 2041–2055.
 19. Mohandas N., Chasis J.A. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids // *Semin. Hematol.* – 1993. – Vol.30, №3. – P. 171–192.
 20. Money N.P. Osmotic pressure of aqueous polyethylene glycols // *Plant Physiol.* – 1989. – Vol. 91, №2. – P. 766–769.
 21. Pallotta V., D'Amici G.M., D'Alessandro A. et al. Red blood cell processing for cryopreservation: from fresh blood to deglycerolization // *Blood Cells Mol. Dis.* – 2012. – Vol. 48, №4. – P. 226–232.
 22. Parpart A., Lorenz P.B., Parpart E.R. et al. The Osmotic Resistance (fragility) of human red cells // *J. Clin. Invest.* – 1947. – Vol. 26, №4 – P. 636–640.
 23. Patel K.V., Mohanty J.G., Kanapuru B. et al. Association of the red cell distribution width with red blood cell deformability // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2013. – №765. – P. 211–216.
 24. Piagnerelli M., Zouaoui Boudjeltia K., Brohee D. et al. Assessment of erythrocyte shape by flow cytometry techniques // *J. Clin. Pathol.* – 2007. – Vol. 60, №5. – P. 549–554.
 25. Pizzi M., Botrugno A., Calderale P.M. Osmotic pressure dependence on solute-solvent interaction: thermodynamic model and experimental verification // *Academy of Sciences of Turin.* – 2008. – №32. – P. 47–63.
 26. Ragoonanan V., Hubel A., Aksan A. Response of the cell membrane-cytoskeleton complex to osmotic and freeze/thaw stresses // *Cryobiology.* – 2010. – Vol. 61, №3. – P. 335–344.
 27. Scott K.L., Lecak J., Acker J.P. Biopreservation of red blood cells: past, present, and future // *Transfus. Med. Rev.* – 2005. – Vol. 19, №2. – P. 127–142.
 28. Stoll C., Holovati J.L., Acker J.P. et al Synergistic effects of liposomes, trehalose, and hydroxyethyl starch for cryopreservation of human erythrocytes // *Biotechnol. Prog.* – 2012. – Vol. 28, №2. – P. 364–371.
 29. Wehner F., Sauer H., Kinne R.K. Hypertonic stress increases the Na⁺ conductance of rat hepatocytes in primary culture // *J. Gen. Physiol.* – 1995. – Vol. 105, №4. – P. 507–535.
 30. Zemlianskykh N.G., Babijchuk L.A. Modification of erythrocyte membrane proteins by polyethylene glycol 1500 // *Biotechnologia acta.* – 2016. – Vol. 9, №5. – P. 54–63.
 20. Piagnerelli M., Zouaoui Boudjeltia K., Brohee D. et al. Assessment of erythrocyte shape by flow cytometry techniques. *J Clin Pathol* 2007; 60(5): 549–554.
 21. Pizzi M., Botrugno A., Calderale P.M. Osmotic pressure dependence on solute-solvent interaction: thermodynamic model and experimental verification. *Academy of Sciences of Turin.* 2008; (32): 47–63.
 22. Ragoonanan V., Hubel A., Aksan A. Response of the cell membrane-cytoskeleton complex to osmotic and freeze/thaw stresses. *Cryobiology* 2010; 61(3): 335–344.
 23. Scott K.L., Lecak J., Acker J.P. Biopreservation of red blood cells: past, present, and future. *Transfus Med Rev* 2005; 19(2): 127–142.
 24. Stoll C., Holovati J.L., Acker J.P. et al. Synergistic effects of liposomes, trehalose, and hydroxyethyl starch for cryopreservation of human erythrocytes. *Biotechnol Prog* 2012; 28(2): 364–371.
 25. Wehner F., Sauer H., Kinne R.K. Hypertonic stress increases the Na⁺ conductance of rat hepatocytes in primary culture. *J Gen Physiol* 1995; 105(4): 507–535.
 26. Zemlianskykh N.G. Effect of substances with cryoprotective properties on surface marker CD44 in human erythrocytes. *Cytology and Genetics* 2016; 50(3): 203–213.
 27. Zemlianskykh N.G., Babijchuk L.A. Modification of erythrocyte membrane proteins by polyethylene glycol 1500. *Biotech Acta* 2016; 9(5): 54–63.
 28. Zemlianskykh N.G., Babijchuk L.A. The changes in erythrocyte Ca²⁺-ATPase activity induced by PEG-1500 and low temperatures. *Cell and Tissue Biology* 2017; 11(2): 104–110.
 29. Zemlyanskikh N.G., Kofanova O.A. Modulation of human erythrocyte Ca²⁺-ATPase activity by glycerol: the role of calmodulin. *Biochemistry (Moscow)* 2006; 71(8): 900–905.
 30. Zemlyanskikh N.G., Khomenko M.V. Human erythrocyte Ca²⁺-ATPase activity in hypertonic media at low and physiological temperatures. *Biologicheskie Membrany* 2006; 23(6): 484–492.

