

УДК 57.043:577.352.4:611.018.51

О.Є. Ніпот, Н.А. Єршова*, О.О. Шапкина, С.С. Єршов, В.М. Кучков

Вплив гліцерину на еритроцити людини і бика в умовах гіпертонічного шоку

UDC 57.043:577.352.4:611.018.51

O.Ye. Nipot, N.A. Yershova*, O.O. Shapkina, S.S. Yershov, V.M. Kuchkov

Glycerol Impact on Human and Bovine Erythrocytes Under Hypertonic Shock

Реферат: У роботі досліджено вплив передінкубації еритроцитів людини і бика у розчинах гліцерину на їх чутливість до гіпертонічного шоку. Показано, що при збільшенні концентрації гліцерину рівень пошкодження клітин значно знижується. Діапазони концентрації криопротектору, при яких відбувається різка зміна чутливості клітин, становлять для людини 0,1–0,5 М, для бика 0,5–1 М. Інкубація еритроцитів обох видів ссавців із гліцерином протягом 10 хв знижує їх чутливість до гіпертонічного шоку. Для еритроцитів людини даний показник знижується поступово, для еритроцитів бика залежність має немонотонний характер. Пошкоджуюча дія гіпертонічного шоку для еритроцитів людини наростає з підвищенням температури від 0 до 10°C, для еритроцитів бика – від 0 до 25°C. Попередня інкубація еритроцитів людини із гліцерином знижує їх гіпертонічне пошкодження при всіх досліджуваних значеннях температури, клітин бика – вище 5°C. Отримані результати свідчать про різний механізм захисту еритроцитів людини і бика за допомогою гліцерину в умовах гіпертонічного шоку. Висока збереженість клітин бика, ймовірно, зумовлена частковою дегідратацією в розчинах гліцерину, що підвищує їх стійкість.

Ключові слова: еритроцити ссавців, гіпертонічний шок, проникаючий криопротектор, гліцерин, температура інкубації, гемоліз.

Реферат: В работе исследовано влияние прединкубации эритроцитов человека и быка в растворах глицерина на их чувствительность к гипертоническому шоку. Показано, что при увеличении концентрации глицерина уровень повреждения клеток значительно снижается. Диапазоны концентраций криопротектора, при которых происходит резкое изменение чувствительности клеток, составляют для человека 0,1–0,5 М, для быка от 0,5–1 М. Инкубация эритроцитов обоих видов млекопитающих с глицерином в течение 10 мин снижает их чувствительность к гипертоническому шоку. Для эритроцитов человека данный показатель снижается постепенно, для эритроцитов быка зависимость имеет немонотонный характер. Повреждающее действие гипертонического шока для эритроцитов человека нарастает с повышением температуры от 0 до 10°C, для эритроцитов быка – от 0 до 25°C. Предварительная инкубация эритроцитов человека с глицерином снижает их гипертоническое повреждение при всех исследуемых значениях температуры, клеток быка – выше 5°C. Полученные результаты свидетельствуют о различном механизме защиты эритроцитов человека и быка с помощью глицерина в условиях гипертонического шока. Высокая сохранность клеток быка, вероятно, обусловлена частичной дегидратацией в растворах глицерина, что повышает их устойчивость.

Ключевые слова: эритроциты млекопитающих, гипертонический шок, проникающий криопротектор, глицерин, температура инкубации, гемолиз.

Abstract: In this study we have studied the impact of preliminary incubation of human and bovine erythrocytes in glycerol solutions on their sensitivity to hypertonic shock. The cell damage was shown to significantly reduce with increasing the glycerol concentration. The ranges of cryoprotectant concentrations, when a sharp change in cell sensitivity occurred, were from 0.1 to 0.5 and 0.5 to 1 M for human and bovine erythrocytes, respectively. The incubation of both mammalian species erythrocytes with glycerol for 10 min reduced their sensitivity to hypertonic shock. For human erythrocytes, this index decreased gradually, and for bovine ones the dependence was not monotone. A damaging effect of hypertonic shock increased with temperature rise from 0 up to 10°C for human erythrocytes and from 0 up to 25°C for bovine cells. Preliminary incubation of human erythrocytes with glycerol decreased their hypertonic damage at all the studied temperatures and for bovine cells it occurred at temperature above 5°C. Our findings testify to a different protective mechanism for human and bovine erythrocytes using glycerol under hypertonic shock conditions. A high survival of bovine cells is probably due to partial dehydration in glycerol solutions, which increases their resistance.

Key words: mammalian erythrocytes, hypertonic shock, penetrating cryoprotectant, glycerol, incubation temperature, hemolysis.

Актуальними завданнями сучасної кріобіології є вдосконалення існуючих, а також розробка нових більш ефективних методів консервування біооб'єктів. На даний час створено ряд протоколів довгострокового зберігання еритроцитів людини за низьких температур, тоді як для еритро-

The topical task in modern cryobiology is to improve the existing techniques for biological object cryopreservation, and designing the novel, more efficient ones. To date, some protocols for human erythrocyte long-term storage under low temperatures have been established, while as for animal cells,

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

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

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

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

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: ershbas@gmail.com

Надійшла 26.06.2018

Прийнята до друку 03.09.2019

Received June, 26, 2018

Accepted September, 03, 2019

© 2019 N.A. Yershova, 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.

цитів тварин вони знаходяться на стадії розробки і вимагають удосконалення з огляду на те, що клітини різних видів ссавців значно відрізняються за характеристиками цитоскелет-мембранного комплексу [5, 8, 11]. Довгострокове зберігання еритроцитів тварин дозволить створити спеціалізовані банки крові. Кріоконсервована кров тварин необхідна для трансфузій при оперативних втручаннях, гострих крововтратах, лікуванні анемічних станів та детоксикації [12–14].

Створення методів низькотемпературного зберігання еритроцитів потребує визначення умов підготовки клітин до заморожування та підбору складу кріозахисних середовищ. Для мінімізації фінансових витрат і часу на розробку протоколів кріоконсервування використовують модельний підхід, який дозволяє дослідити вплив окремих факторів кріопошкодження на біооб'єкт. У роботі ми досліджували гіпертонічний шок з метою моделювання впливу на клітини висококонцентрованих сольових розчинів як одного з основних факторів кріопошкодження [1].

У процесі низькотемпературного зберігання еритроцитів людини в якості кріопротектору використовують гліцерин, який легко проникає в еритроцити і захищає їх під час заморожування, перешкоджаючи формуванню кристалів льоду [7, 9].

Після кріоконсервування еритроцитів бика з гліцерином за методом, розробленим для еритроцитів людини, було отримано негативний результат, який може бути пов'язаний з низькою проникністю еритроцитів бика для цього кріопротектору [3]. Таким чином, для успішного кріоконсервування еритроцитів бика необхідно удосконалення існуючих методів.

У зв'язку з цим у модельному експерименті було доцільним визначити параметри передінкубації (час, концентрація кріопротектору, температура середовища), які впливають на збереженість еритроцитів людини і бика.

Мета роботи – дослідження впливу умов передінкубації еритроцитів людини і бика у розчинах гліцерину на чутливість клітин до дії гіпертонічного шоку (4,0 М NaCl).

Матеріали та методи

У роботі були використані еритроцити бика, заготовлені з гемоконсервантом «Глюгіцир» («Біофарма», Україна). Експерименти проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447–IV від 21.02.2006 р.) із дотриманням вимог Комітету з біоетики Інституту, узгоджених із положенням «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, які використовуються в експерименталь-

they are under development and should be improved due to a significant difference by characteristics of cytoskeleton-membrane complex among the cells of different mammalian species [2, 7, 10]. A long-term storage of animal erythrocytes will enable establishing the specialized blood banks. The cryopreserved animal blood is necessary for transfusion in surgeries, acute blood loss, therapy of anemia and detoxication as well [11–13].

In order to create the techniques for erythrocyte low-temperature storage it is necessary to determine the appropriate conditions of cell preparation for freezing and to select the cryoprotective media composition. To minimize the budget and time for elaborating cryopreservation protocols, one applies a model approach, enabling to investigate the impact of certain cryopreservation factors on cells. Here, we have studied a hypertonic shock to simulate the impact of hypertonic saline on cells as one of the main factors of cryodamage [1].

Usually, for human erythrocyte low temperature storage one uses glycerol as a cryoprotectant. It can easily penetrate into human erythrocytes and protect them during freezing, preventing thereby the ice crystal formation [6, 8].

The cryopreservation of bovine erythrocytes with glycerol by the designed technique for human cells was unsuccessful, that could result from a low permeability of bovine erythrocytes for this cryoprotectant [5]. Thus, for successful cryopreservation of bovine erythrocytes, the existing techniques should be improved.

Therefore, in this model experiment it was expedient to determine the parameters of preliminary incubation (time, cryoprotectant concentration, medium temperature), affecting human and bovine erythrocyte survival rates.

The research was aimed to study the impact of preliminary incubation of human and bovine erythrocytes in glycerol solutions on cell sensitivity to hypertonic shock (4.0 M NaCl).

Materials and methods

In this study we used the bovine erythrocytes, collected to blood preservative Glugicir (Biopharm, Ukraine). The experiments were carried out in accordance with the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty' (N 3447-IV of February 21, 2006), in compliance with the requirements of the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, agreed to the statements of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other



них та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986). Еритроцити тричі піддавали 3-хвилинному осадженню на центрифугу «ОПн-3.02» («Дастан», Киргизстан) при 1000g у 10-кратному об'ємі фізіологічного розчину (NaCl 0,15 М; фосфатний буфер 0,01 М, рН 7,4). Лейкоцитарну плівку і супернатант видаляли аспірацією після кожного центрифугування. Еритроцити зберігали у вигляді щільного осаду не більше 4 годин при температурі 0°C. Усі середовища готували на фосфатному буфері (0,01 М, рН 7,4).

Попередню інкубацію еритроцитів ссавців проводили в розчинах, які містять 0,2–2,0 М гліцерину, впродовж 1–10 хв при температурі 22°C. Еритроцити ссавців піддавали гіпертонічному шоку перенесенням суспензії клітин у розчин, що містить 4,0 М NaCl, ізотермічно (кінцевий гематокрит 0,4%). Середовище з гліцерином готували на фізіологічному розчині (0,15 М NaCl; 0,01 М фосфатний буфер, рН 7,4). Рівень гемолізу еритроцитів вимірювали спектрофотометричним методом при довжині хвилі 543 нм і розраховували у відсотках по відношенню до 100% гемолізу.

Кожен експеримент проводили не менше 6 разів на двох паралельних пробах. Для всіх зразків обчислювали середнє арифметичне значення і значення середньоквадратичної помилки ($M \pm m$).

Результати та обговорення

На рис. 1 показано залежності рівня гіпертонічного гемолізу еритроцитів людини і бика від концентрації гліцерину в середовищі попередньої інкубації при кімнатній температурі. Час витримки еритроцитів із кріопротектором (5 хв) обирали з даних попередніх експериментів і вважали достатнім для прояву його захисної дії гліцерину. Встановлено, що при збільшенні концентрації гліцерину від 0,1 до 0,5 М ступінь пошкодження клітин людини значно знижується. Подальше збільшення концентрації кріопротектору практично не впливало на рівень гіпертонічного гемолізу. Аналогічні дослідження еритроцитів бика виявили інший характер концентраційної залежності: збільшення концентрації гліцерину в середовищі передінкубації (від 0,1 до 0,5 М) викликало незначне зниження рівня гіпертонічного гемолізу; подальше збільшення концентрації кріопротектору (від 0,5 до 1,0 М) – різке зниження рівня пошкодження еритроцитів, а у діапазоні від 1,0 до 1,5 М рівень гіпертонічного ушкодження не змінювався.

Слід зазначити, що при досягненні мінімального рівня гіпертонічного пошкодження захисна дія гліцерину по відношенню до еритроцитів бика більш виражена.

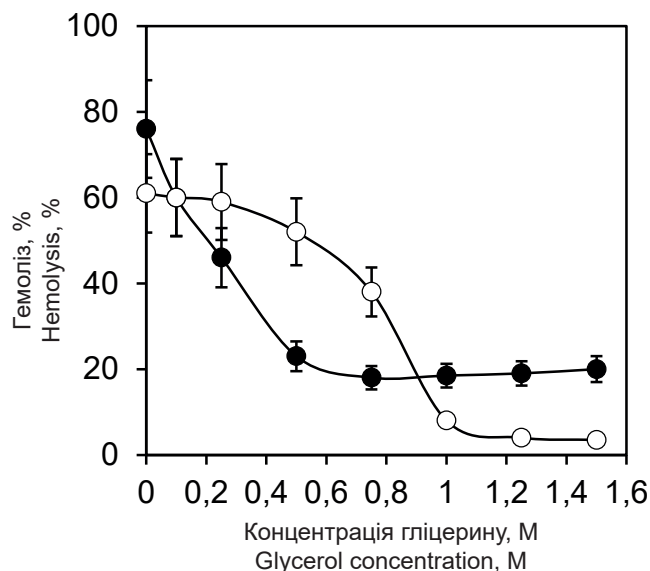


Рис. 1. Залежність рівня гіпертонічного гемолізу еритроцитів людини (●) і бика (○) від концентрації гліцерину в середовищі передінкубації.

Fig. 1. Dependency of hypertonic hemolysis level in human (●) and bovine (○) erythrocytes on glycerol concentration in medium prior to incubation.

Scientific Purposes (Strasburg, 1986). The erythrocytes were precipitated for 3 min with centrifuge ‘OPN-3.02’ (Dastan, Kyrgyzstan) at 1000g in a 10-fold volume of physiological saline (NaCl 0.15 M, phosphate buffered saline 0.01 M, pH 7.4). The buffy coat layer and supernatant were removed by aspiration after each centrifugation. Erythrocytes were stored as a dense precipitate not longer than 4 hrs at 0°C. All the media were prepared with phosphate buffered saline (0.01 M, pH 7.4).

The mammalian erythrocytes were preliminary incubated in the 0.2–2.0 M glycerol-contained solutions within 1–10 min at 22°C. Mammalian erythrocytes were isothermally subjected to hypertonic shock by transferring cell suspension into the solution, containing 4.0 M NaCl (final hematocrit 0.4%). Glycerol solutions were prepared with physiological saline (0.15 M NaCl, 0.01 M phosphate buffered saline, pH 7.4). The level of erythrocyte hemolysis was measured spectrophotometrically at 543 μm wavelength and assumed as a percentage to 100% hemolysis.

Each experiment was performed at least 6 times in two parallel samples. For all the samples, the arithmetic mean and the mean squared error ($M \pm m$) were calculated.

Results and discussion

The Fig. 1 shows the dependency of hypertonic hemolysis level of human and bovine erythrocytes on glycerol concentration in preliminary incubation medium at room temperature. The time of ery-

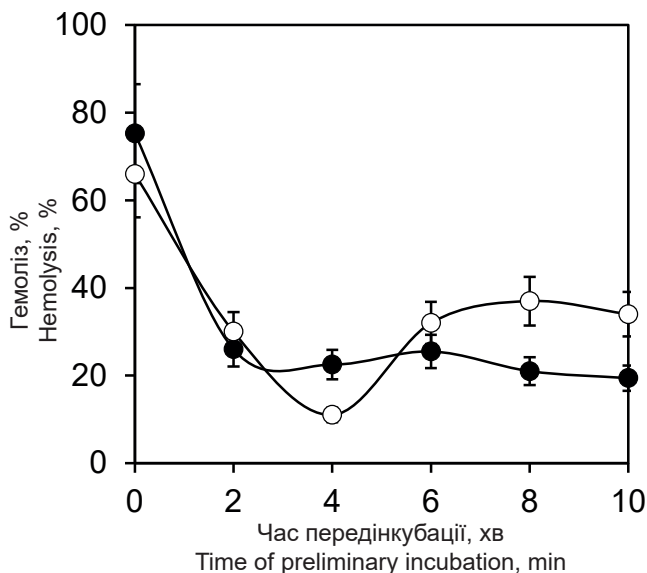


Рис. 2. Вплив часу передінкубації з гліцерином на рівень гіпертонічного гемолізу еритроцитів людини (●) і бика (○).

Fig. 2. Time impact of preliminary incubation with glycerol on level of hypertonic hemolysis in human (●) and bovine (○) erythrocytes.

Для з'ясування впливу часу попередньої інкубації з гліцерином на рівень гіпертонічного пошкодження еритроцитів їх витримували від 1 до 10 хв за температури 22°C. Були обрані концентрації кріопротектору, за яких рівень пошкодження після 5-хвилинної інкубації знижується на 50%: для еритроцитів людини – 0,3 М, еритроцитів бика – 0,75 М. Видно, що для еритроцитів людини даний показник поступово знижується зі збільшенням часу інкубації (рис. 2). Для еритроцитів бика залежність має немонотонний характер: спочатку відбувається різке зниження рівня гемолізу (до 5%), потім невелике його зростання і швидкий вихід на плато.

За даними рис. 1 і 2 можна зробити висновок, що однаковий рівень збереження еритроцитів може бути досягнутий як внаслідок зміни концентрації кріопротектору, так і часу їх передінкубації в розчині гліцерину.

Представляло інтерес дослідити, як змінюється рівень пошкодження еритроцитів людини і бика після інкубації з кріопротектором при різній температурі. На підставі отриманих даних (рис. 1 і 2) було обрано час попередньої інкубації (2 і 5 хв) та концентрацію гліцерину для еритроцитів людини (0,3 М) бика (0,75 М). Встановлено, що пошкоджуюча дія гіпертонічного шоку наростає з підвищенням температури: для еритроцитів людини – до 10°C, бика – до 25°C (рис. 3). Попередня інкубація з гліцерином знижує рівень гіпертонічного пошкодження еритроцитів людини при всіх досліджуваних значеннях

throcyte exposure with cryoprotectant (5 min) was selected from previously reported data and considered to be sufficient for glycerol protective effect manifestation. It was established that with an increase in glycerol concentration from 0.1 up to 0.5 M, the degree of human cell damage was significantly reduced. A further increase in cryoprotectant concentration caused virtually no effect on the level of hypertonic hemolysis. Similar studies of bovine erythrocytes revealed a different type of concentration dependence, *i. e.* an increase in glycerol concentration in preliminary incubation medium (from 0.1 to 0.5 M) caused a slight decrease in the level of hypertonic hemolysis; further increase in cryoprotectant concentration (from 0.5 up to 1.0 M) caused a sharp decrease in the level of erythrocyte damage, and within the range from 1.0 to 1.5 M the level of hypertonic damage remained unchanged.

Of note is the fact, that when the minimum level of hypertonic damage is achieved, a protective effect of glycerol as for bovine erythrocytes is more pronounced.

In order to elucidate the time impact of preliminary incubation with glycerol on the level of hypertonic damage of erythrocytes, they were exposed from 1 to 10 min at 22°C. The cryoprotectant concentrations, when the level of damage after a 5-min incubation reduced by 50%, were selected, *i. e.* 0.3 and 0.75 M for human and bovine erythrocytes, respectively. It is seen that for human erythrocytes this index is gradually reduced with incubation time rise (Fig. 2). For bovine erythrocytes the dependency is not monotonic, *i. e.* first, the hemolysis level sharply decreased (down to 5%), then it slightly increased and reached the plateau.

According to the Fig. 1 and 2 data we may conclude that it is possible to achieve the same level of erythrocytes survival rate both by changing cryoprotectant concentration and time of their preliminary incubation in glycerol solution.

Of interest was to investigate how the damage level of human and bovine erythrocytes changed after incubation with cryoprotectant at different temperatures. Proceeding from the data obtained (Fig. 1 and 2), we selected the time of preliminary incubation (2 and 5 min) and glycerol concentration for human and bovine erythrocytes (0.3 and 0.75 M, respectively). A damaging effect of hypertonic shock was revealed to augment with temperature increase, *i. e.* up to 10 and 25°C for human and bovine erythrocytes, respectively (Fig. 3). Preliminary incubation with glycerol reduced the level of hypertonic damage at all the studied

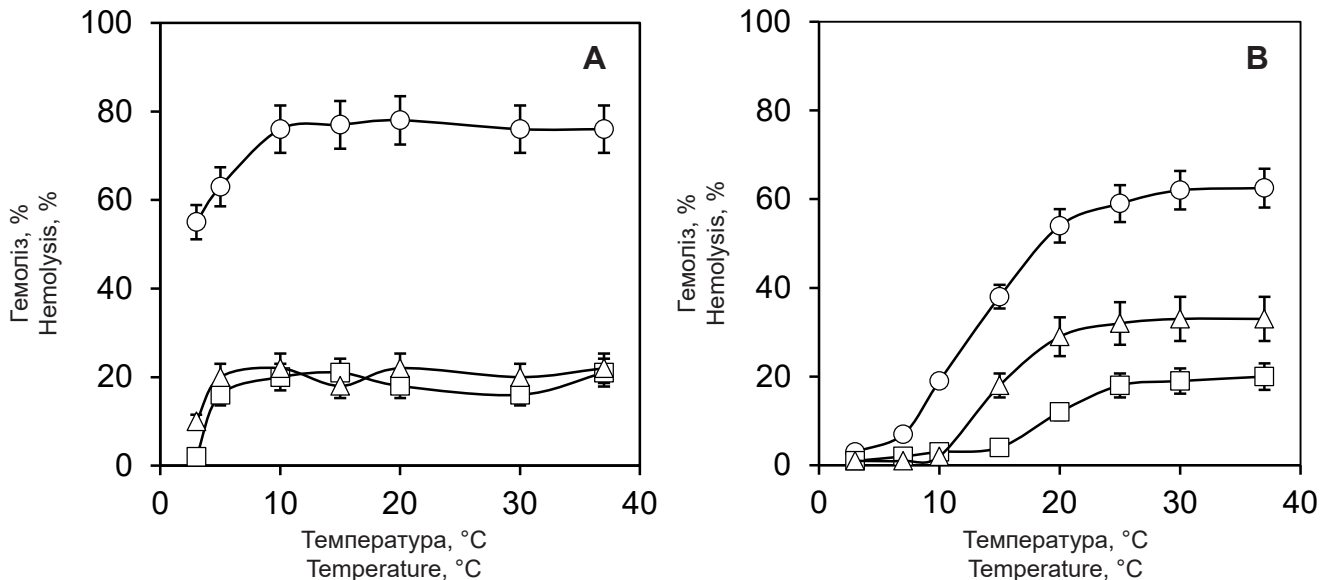


Рис. 3. Вплив температури на гемоліз еритроцитів людини (А) і бика (В) в 4,0 М NaCl: ○ – без гліцерину (контроль); □ – 2-хвилинна передінкубація з гліцериним; Δ – 5-хвилинна передінкубація з гліцериним.
Fig. 3. Temperature impact on human (А) and bovine (В) erythrocyte hemolysis in 4.0 М NaCl: ○ – no glycerol (control); □ – 2-min preliminary incubation with glycerol; Δ – 5-min preliminary incubation with glycerol.

температури, бика – вище 5°C. Для еритроцитів бика максимальна захисна дія гліцерину спостерігається після 2-хвилинної інкубації, для еритроцитів людини вона не залежить від часу передінкубації з криопротектором у всьому досліджуваному температурному діапазоні.

Еритроцити людини і бика значно відрізняються за швидкістю проникнення гліцерину. Для еритроцитів людини перерозподіл криопротектору відбувається протягом декількох хвилин і захисний ефект буде визначатися його внутрішньоклітинною концентрацією на даний момент часу (див. рис. 2). Гліцерин буде перешкоджати виходу води з клітини, а, отже, надлишковій дегідратації і пошкодженню мембрани за умов гіпертонічного шоку [4]. Для еритроцитів бика внутрішньоклітинна концентрація криопротектора підвищується дуже повільно і не змінюється в межах досліджуваного нами часового діапазону [9]. Отже, механізми захисту клітин цих видів ссавців різні, що пояснює низький рівень збереження еритроцитів бика при використанні методики криоконсервування еритроцитів людини.

Відомо, що гліцерин проникає в еритроцити людини переважно каналним шляхом за допомогою аквапорину AQP3 [9]. У роботі E. Campos та співавт. [6] було вивчено вплив експресії AQP3 на проникнення гліцерину в еритроцити людини і бика, визначено величини коефіцієнтів проникності та енергії активації цього процесу. Для еритроцитів бика отримані значення проникності гліцерину на три порядки нижчі, ніж

temperatures for human erythrocytes, and at those higher than 5°C for bovine ones. For bovine erythrocytes the maximum protective effect of glycerol was observed after a 2-min incubation, and as for human cells, it was unaffected by the time of preliminary incubation with cryoprotectant within all the studied temperature range.

Human and bovine erythrocytes differ significantly in glycerol penetration rate. For human erythrocytes, the cryoprotectant redistribution occurs within a few minutes and a protective effect will be determined by its intracellular concentration for the moment (see Fig. 2). Glycerol will prevent the water release out of cell, and an excessive dehydration and membrane damage under hypertonic shock as well [14]. For bovine erythrocytes, an intracellular concentration of cryoprotectant increases very slowly and remains unchanged within the time range we studied [8]. Thus, the mechanisms of cell protection in these mammalian species are different, explaining a low level of bovine erythrocyte survival rate using the technique, applied for human cells.

It is known that glycerol penetrates into human erythrocytes mostly through channels by means of aquaporin AQP3 [8]. E. Campos *et al.* [3] have studied the impact of AQP3 expression on glycerol penetration into human and bovine erythrocytes and determined the values of permeability and activation energy coefficients of this process. For bovine erythrocytes the obtained values of glycerol permeability were three orders lower than for human ones ($(1.37 \pm 0.26 \times 10^{-5})$ cm/sec), indicating thereby

для людини ($(1,37 \pm 0,26 \times 10^{-5})$ см/с), що вказує на різні шляхи його проникнення в еритроцити людини та еритроцити бика ($(5,82 \pm 0,37 \times 10^{-8})$ см/с). Цей факт підтверджується високим значенням енергії активації для еритроцитів бика ($(8,52 \pm 0,81)$ ккал/моль) порівняно з еритроцитами людини ($(19,13 \pm 1,65)$ ккал/моль) і вказує на ліпідний, а не білковий шлях проникнення гліцерину. Відсутність експресії AQP3 у мембранах еритроцитів бика пояснює виявлену низьку гліцеринову проникність і також підтверджує ліпідний шлях проникнення гліцерину у ці клітини [6].

Дані, що отримані в роботах із заморожування еритроцитів бика, значно розрізняються через використання різних температурних і швидкісних режимів охолодження [2, 3, 10]. Причиною таких відмінностей, можливо, є різний кількісний перерозподіл кріопротектору в момент заморожування. S.P. Leibo показав [10], що варіюванням часу інкубації з гліцерином можна змінити чутливість еритроцитів бика до заморожування-відігріву. При цьому крива, яка відображає пошкодження клітин (крива чутливості клітин), має мінімум при певному часі інкубації, що узгоджується з даними нашої роботи. Так, на рис. 2 видно, що крива гіпертонічного пошкодження має виражений мінімум при певному часі передінкубації клітин із гліцерином, причому він зберігається в досить широкому температурному діапазоні (див. рис. 3).

На нашу думку, захисний ефект передінкубації еритроцитів бика з гліцерином може бути пов'язаний з частковою дегідратацією клітин в розчині гліцерину та адсорбцією молекул кріопротектору на мембрані еритроцита, що підвищує стійкість еритроцитів до гіпертонічного шоку .

Висновки

Встановлено, що проникаючий кріопротектор гліцерин має захисний ефект в умовах гіпертонічного шоку по відношенню до еритроцитів людини і бика. Для еритроцитів бика гліцерин проявляє захисну дію навіть за умов нетривалого впливу кріопротектору, що не дозволяє йому проникнути у клітину. Отримані дані дозволяють зробити висновок, що механізм захисту еритроцитів за допомогою гліцерину відрізняється для клітин цих ссавців. Це обумовлює необхідність розробки окремих методів кріоконсервування еритроцитів різних видів ссавців. Крім того, з огляду на дані попередніх досліджень і отримані нами результати можна вважати, що модельні експерименти з вивчення основних факторів кріопошкоджень можуть використовуватися для більш глибокого розуміння процесів у кліти-

different ways of its penetration into human and bovine erythrocytes ($(5.82 \pm 0.37 \times 10^{-8})$ cm/sec). This fact is confirmed by a high value of activation energy for bovine erythrocytes ((8.52 ± 0.81) kcal/mol) as compared with human ones ((19.13 ± 1.65) kcal/mol) and indicates a lipid, but not protein pathway of glycerol penetration. No AQP3 expression in bovine erythrocyte membranes explains the revealed low glycerol permeability and confirms the lipid way of glycerol penetration into these cells as well [3].

The data reported on bovine erythrocyte freezing significantly differ because various temperature and cooling regimens were used [4, 5, 9]. These distinctions probably result from a different quantitative redistribution of cryoprotectant at the time of freezing. S.P. Leibo [9] showed the varying of incubation time with glycerol as capable to change the bovine erythrocyte sensitivity to freeze-thawing. Herewith, the curve, showing the cell damage (cell sensitivity curve) has a minimum at a certain incubation time, that is consistent with our findings. Thus, the Fig. 2 demonstrates the hypertonic damage curve to have a pronounced minimum at a certain time of preliminary cell incubation with glycerol, moreover it is stored in quite a wide temperature range (see Fig. 3).

We believe that a protective effect of preliminary incubation of bovine erythrocytes with glycerol may be due to a partial cell dehydration in glycerol solution and adsorption of cryoprotectant molecules on erythrocyte membrane, that increases the erythrocyte resistance to hypertonic shock.

Conclusions

The penetrating cryoprotectant glycerol was established to have a protective effect under hypertonic shock as for human and bovine erythrocytes. For bovine cells, glycerol has a protective effect even under a short-term exposure to cryoprotectant, preventing thereby its penetration into cell. Our findings enabled concluding that a protective mechanism for erythrocytes by means of glycerol was different for these mammalian cells. This stipulates the need to design the specific cryopreservation techniques for erythrocytes of different mammalian species. In addition, proceeding from previous data and our findings as well, the model experiments on studying the main factors of cryodamages may be considered as applicable for deeper understanding the processes in cells under the temperature and osmotic factors impact, and designing the freezing techniques for biological objects.



нах за умов впливу температурних і осмотичних факторів, а також для розробки методів заморожування біооб'єктів.

Література

1. Александрова ДИ, Орлова НВ, Шпакова НМ. Сравнительное исследование чувствительности предварительно обезвоженных эритроцитов человека и быка к гипертоническому стрессу. Проблемы криобиологии. 2007; 17(4): 327–34.
2. Денисова ОМ, Жегунов ГФ, Хасбауи ХА, Ващенко ВВ. Ефективність використання комбінованих середовищ для криоконсервування еритроцитів бика. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького 2013; 15 (3): 71–7.
3. Денисова ОН, Жегунов ГФ, Бабийчук ЛА. Криоконсервирование эритроцитов животных под защитой диметилсульфоксида, полиэтиленоксида, глицерина. Проблемы криобиологии. 2005; 15(2): 195–201.
4. Шпакова НМ, Орлова НВ, Нипот ЕЕ, и др. Осмотическая чувствительность эритроцитов млекопитающих при модификации их исходного состояния. Вісник проблем біології і медицини. 2016; (№3, Ч. 2): 356–61.
5. Benga G. Comparative studies of water permeability of red blood cells from humans and over 30 animal species: an overview of 20 years of collaboration with Philip Kuchel. Eur Biophys J. 2013; 42(1): 33–46.
6. Campos E, Moura TF, Oliva A, et al. Lack of aquaporin 3 in bovine erythrocyte membranes correlates with low glycerol permeation. Biochem Biophys Res Comm. 2011; 408(3): 477–81.
7. Elliott GD, Fuller BJ., Wang S. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. Cryobiology. 2017; 76: 74–91.
8. Florin-Christensen J, Suarez CE, Florin-Christensen MA. Unique phospholipid organization in bovine erythrocyte membranes. PNAS. 2001; 98(14): 7736–41.
9. Lahmann JM, Benson JD, Higgins AZ. Concentration dependence of the cell membrane permeability to cryoprotectant and water and implications for design of methods for postthaw washing of human erythrocytes. Cryobiology. 2018; 80: 1–11.
10. Leibo SP. Freezing damage of bovine erythrocytes: simulation using glycerol concentration changes at subzero temperatures. Cryobiology. 1976; 13: 587–98.
11. Liu L, Lei T, Bankir L, et al. Erythrocyte permeability to urea and water: comparative study in rodents, ruminants, carnivores, humans, and birds. J Comp Physiol B. 2011; 181(1): 65–72.
12. Obrador R, Musulin S, Hansen BJ. Red blood cell storage lesion. JVECC. 2015; 25(2): 187–99.
13. Pogozykh D, Pakhomova Y, Pervushina O, et al. Exploring the possibility of cryopreservation of feline and canine erythrocytes by rapid freezing with penetrating and non-penetrating. Cryoprotectants. PLoS One [Internet]. 2017; 12(1): 1–16. [Cited Jan 10, 2018]. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0169689>.
14. Rozanski E, de Laforcade AM. Transfusion medicine in veterinary emergency and critical care medicine. Clin Tech Small An P. 2004; 19(2): 83–7.

References

1. Aleksandrova DI, Orlova NV, Shpakova NM. Comparative study of preliminarily dehydrated human and bovine erythrocyte sensitivity to hypertonic stress. Problems of Cryobiology. 2007; 17(4): 327–34.
2. Benga G. Comparative studies of water permeability of red blood cells from humans and over 30 animal species: an overview of 20 years of collaboration with Philip Kuchel. Eur Biophys J. 2013; 42(1): 33–46.
3. Campos E, Moura TF, Oliva A, et al. Lack of aquaporin 3 in bovine erythrocyte membranes correlates with low glycerol permeation. Biochem Biophys Res Comm. 2011; 408(3): 477–81.
4. Denisova ON, Zhegunov GF, Hachbaui HA, Vachenko BB. [Efficiency of combined media application for bovine erythrocyte cryopreservation]. Scientific Bulletin of Lviv National Stepan Gzhytsky University of Veterinary Medicine and Biotechnology. 2013; 15(3): 71–7. Ukrainian.
5. Denisova ON, Zhegunov GF, Babijchuk LA. Cryopreservation of animal's erythrocytes under dimethyl sulfoxide, polyethylene oxide and glycerol protection. Problems of Cryobiology 2005; 15(2): 195–201.
6. Elliott GD, Fuller BJ., Wang S. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. Cryobiology. 2017; 76: 74–91.
7. Florin-Christensen J, Suarez CE, Florin-Christensen MA. Unique phospholipid organization in bovine erythrocyte membranes. PNAS. 2001; 98(14): 7736–41.
8. Lahmann JM, Benson JD, Higgins AZ. Concentration dependence of the cell membrane permeability to cryoprotectant and water and implications for design of methods for postthaw washing of human erythrocytes. Cryobiology. 2018; 80: 1–11.
9. Leibo SP. Freezing damage of bovine erythrocytes: simulation using glycerol concentration changes at subzero temperatures. Cryobiology. 1976; 13(6): 587–98.
10. Liu L, Lei T, Bankir L, et al. Erythrocyte permeability to urea and water: comparative study in rodents, ruminants, carnivores, humans, and birds. J Comp Physiol B. 2011; 181(1): 65–72.
11. Obrador R, Musulin S, Hansen BJ. Red blood cell storage lesion. J Vet Emerg Crit Care. 2015; 25(2): 187–99.
12. Pogozykh D, Pakhomova Y, Pervushina O, et al. Exploring the possibility of cryopreservation of feline and canine erythrocytes by rapid freezing with penetrating and non-penetrating cryoprotectants. PLoS One [Internet]. 2017; 12(1): 1–16. [Cited Jan 10, 2018]. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0169689>.
13. Rozanski E, de Laforcade AM. Transfusion medicine in veterinary emergency and critical care medicine. Clin Tech Small Anim Pract. 2004; 19(2): 83–7.
14. Shpakova NM, Orlova NV, Nipot EE, et al. [Osmotic sensitivity of mammalian erythrocytes under their initial state modification]. Visnyk Problem Biol Med. 2016; №3, pt. 2; 356–61. Russian.

