

••• КРІОБІОЛОГІЯ ••• CRYOBIOLOGY •••

DOI: 10.26565/2075-5457-2023-40-2
УДК: 591.111.1:577.352.462

Зміна чутливості еритроцитів ссавців до гіпертонічного шоку та криогемолізу за попередньої обробки фенілгідразином

О.Є. Ніпот, Н.А. Єршова, С.С. Єршов, О.О. Чабаненко, Н.М. Шпакова

У роботі досліджено вплив попередньої обробки еритроцитів ссавців фенілгідразином на їх чутливість до гіпертонічного шоку та гіпертонічного криогемолізу. Результати експериментів показали, що чутливість інтактних еритроцитів ссавців до цих стресових впливів є видоспецифічною. Вона може визначатися відмінностями в білковому і фосфоліпідному складі досліджуваних еритроцитів. Більш чутливими до гіпертонічного шоку за температури 37 і 0°C є еритроцити людини, до гіпертонічного криогемолізу – людини та коня. Встановлено, що в умовах гіпертонічного шоку ступінь лізису еритроцитів кролика однаковий за 37 і 0°C, а для еритроцитів бика значно відрізняється. Обробка фенілгідразином змінює чутливість еритроцитів деяких із досліджених ссавців до гіпертонічного шоку та усіх досліджених ссавців до гіпертонічного криогемолізу. Отримані результати показали, що за умов гіпертонічного шоку при 37°C чутливість клітин людини та бика знижується, кролика – не змінюється, коня – зростає, та у всіх досліджених видів збільшується за 0°C. Слід зазначити, що чутливість еритроцитів коня до гіпертонічного пошкодження значно підвищується (майже вдвічі) за температури 0 та 37°C, а чутливість еритроцитів кролика не змінюється при 37°C. За умов гіпертонічного криогемолізу ступінь лізису клітин після обробки фенілгідразином стає однаковим для еритроцитів усіх видів досліджуваних ссавців, тобто дія стресу перестала бути видоспецифічною, а стає універсальною. З огляду на дані, що вказують на вплив фенілгідразину саме на білкову частину цитоскелет-мембранного комплексу еритроцитів, можна зробити припущення, що білкова складова цитоскелету є визначальною у реакції еритроцитів ссавців на дію гіпертонічного криогемолізу. Що стосується гіпертонічного шоку, оскільки видоспецифічність реакції еритроцитів ссавців на стресову дію зберігається після впливу фенілгідразину на мембранні білки, можливо, інші структури, наприклад, ліпідна складова мембрани, визначають чутливість еритроцитів до дії цього виду стресу.

Ключові слова: еритроцити ссавців, фенілгідразин, гіпертонічний шок, гіпертонічний криогемоліз, цитоскелет.

Цитування: Ніпот О.Є., Єршова Н.А., Єршов С.С., Чабаненко О.О., Шпакова Н.М. Зміна чутливості еритроцитів ссавців до гіпертонічного шоку та криогемолізу за попередньої обробки фенілгідразином. *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія «Біологія», 2023, 40, 19–25.* <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2023-40-2>

Про авторів:

О.Є. Ніпот – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, Україна, 61015, nipotel71@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2877-8896>

Н.А. Єршова – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, Україна, 61015, ershbas@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9332-6752>

С.С. Єршов – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, Україна, 61015, erisovsupei@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6136-1825>

О.О. Чабаненко – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, Україна, 61015, chabanenkooolena@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-1977-3495>

Н.М. Шпакова – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, Україна, 61015, starling.nataly@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-0148-7522>

Подано до редакції: 15.03.2023 / Прорецензовано: 18.04.2023 / Прийнято до друку: 24.05.2023

Вступ

Механізм пошкодження клітин під час кріоконсервації наразі чітко не встановлений. Серед важливих факторів ушкодження при кріоконсервуванні біологічного матеріалу є зміна температури та концентрування позаклітинного розчину, пов'язане з фазовими змінами води за низьких температур (Jang et al., 2017; Wojci et al., 2021). Для визначення вкладу кожного з них у загальне кріопошкодження клітин використовують модельні експерименти, результати яких можна екстраполювати на реальні процеси (Chabanenko et al., 2020). У роботі використовувалися

гіпертонічний шок та гіпертонічний криогемоліз еритроцитів, що моделюють ушкоджуючу дію осмотичного та температурного впливу при криоконсервації (Shpakova et al., 2010; Shpakova, 2010).

Об'єктом дослідження були еритроцити декількох видів ссавців. Усі вони мають ліпідно-білкову мембрану та заснований на спектрині білковий субмембранний скелет. Однак, ліпідний та білковий склад еритроцитів ссавців, взаємодія та організація білкових субодиноць у межах їх цитоскелет-мембранного комплексу характеризуються видоспецифічністю (Florin-Christensen et al., 2001; Matei et al., 2000). Це визначає особливості механічних (еластичність, здатність до деформації) та фізіологічних (транспорт речовин через мембрану, швидкість метаболічних реакцій) параметрів клітини (Benga, 2013; Ivanov et al., 2020; Benga, Cox, 2022; Varga et al., 2022). І, як наслідок, реакцію клітин на стресову дію. Порівняння даних, що отримані для еритроцитів різних ссавців, дозволить визначити, чи є стресова дія універсальною, що не залежить від особливостей цитоскелет-мембранного комплексу, чи вона є видоспецифічною, тобто чутливість клітин до стресу визначається видом ссавців.

Фенілгідразин – речовина, відома як модифікатор цитоскелет-мембранного комплексу, що змінює стан гемоглобіну, спектрину та ще деяких мембранних білків, він викликає вибіркочку асоціацію окислених ланцюгів альфа-глобіну з мембранним скелетом (Berger, 2007). Його застосування дозволить відокремити внесок певних структур у реакцію клітини на стрес.

Відповідно до цього, метою роботи було дослідити зміну чутливості еритроцитів ссавців до гіпертонічного шоку та гіпертонічного криогемолізу за умов обробки клітин фенілгідразином.

Матеріали та методи дослідження

В експериментах були використані еритроцити людини, кролика, коня та бика. Донорська кров здорових чоловіків А (II)+ групи була надана Харківським обласним центром служби крові. Кров була заготовлена на консерванті «Глюгіцир» «Біофарма», Україна. Для отримання крові ссавців використовували статевозрілих самців 12-місячних кроликів, які були надані віварієм Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Кров бика і коня була надана Харківською державною зооветеринарною академією. Збір крові у тварин здійснювали з використанням розчину гепарину (500 од/мл). Після видалення плазми еритромасу двічі відмивали шляхом центрифугування при 1000 г протягом 3 хвилин у 10-кратному об'ємі фізіологічного розчину (NaCl 0,15 моль/л; Na-фосфатний буфер 0,01 моль/л, pH 7,4). Лейкоцитарну плівку і супернатант видаляли аспірацією після кожного центрифугування. Еритроцити зберігали у вигляді щільного осаду не більше 4 годин за температури 0°C.

Осмоляльність розчинів визначали із використанням осмометру ОМКА-1Ц-01 («Медлабортехніка», Україна). Заготівлю крові тварин і всі маніпуляції проводили згідно з вітчизняними та міжнародними біоетичними нормами, матеріалами IV Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (ETS 123) (Страсбург, 1986), і законодавчими документами України щодо проведення експериментів на тваринах. Дослідження виконували при дотриманні вимог Комітету з біоетики Інституту проблем кріобіології та кріомедицини НАН України.

Для створення гіпертонічного шоку клітини переносили в розчин, що містить 4,0 моль/л NaCl, на 5 хв за температури 37 або 0°C (кінцевий гематокрит 0,4%) (Shpakova, 2010). Гіпертонічний криогемоліз еритроцитів проводили шляхом поміщення еритроцитів у розчин NaCl, 0,8 чи 1,2 моль/л при температурі 37°C на 10 хв, з подальшим перенесенням аліквоти в розчин тієї ж тоничності, охолоджений до 0°C, на 10 хв (Шпакова та ін., 2010). Кількість гемоглобіну, що вийшов в супернатант, визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 543 нм. За 100% приймали поглинання проби, в яку додавали детергент тритон X-100 в концентрації 0,1%.

Обробку еритроцитів фенілгідразином здійснювали за наступною методикою. Клітини в умовах постійного перемішування (гематокрит 5%) інкубували у фізіологічному розчині (NaCl 0,15 моль/л; Na-фосфатний буфер 0,01 моль/л, pH 7,4), що містить фенілгідразин у концентрації 1 ммоль/л, за температури 37°C протягом 10 хв. Потім еритроцити двічі відмивали фізіологічним розчином і використовували у подальшій роботі (Arduini et al., 1989).

Результати проаналізовано методами варіаційної статистики. Для перевірки нормальності розподілу кількісних показників у групах використовували критерій Шапіро-Вілка. Статистичну значущість відмінностей обчислювали за допомогою критерію Стьюдента. Для всіх зразків проводився розрахунок середніх значень та стандартної похибки ($M \pm m$). Значення $p < 0,05$ вважали

статистично вірогідними. Кожний експеримент повторювали не менше 6 разів у двох паралельних пробах.

Результати досліджень та їх обговорення

Табл. 1 та 2 містять дані про рівень гіпертонічного гемолізу еритроцитів ссавців при 37 та 0°C відповідно. Видно, що рівень гіпертонічного гемолізу залежить від видової приналежності клітин. Клітини кожного ссавця мають певні особливості реакції на гіпертонічне пошкодження. Так, еритроцити людини є найбільш чутливими серед досліджених при обох температурах, що збігається з результатами роботи (Shpakova, 2010). Рівень пошкодження еритроцитів кролика однаковий при 0 та 37°C, а еритроцитів бика – значно відрізняється.

Таблиця 1. Вплив попередньої обробки фенілгідразином (1,0 ммоль/л) на рівень гіпертонічного гемолізу еритроцитів ссавців при температурі 37°C

Table 1. Effect of phenylhydrazine (1.0 mmol/L) pretreatment on the level of hypertonic hemolysis of mammalian erythrocytes at 37°C

Видоприналежність еритроцитів	Людина	Кролик	Кінь	Бик
Контрольні клітини	86±8	20±4*	46±6*	68±5*
Клітини, що оброблені фенілгідразином	70±6**	23±6*	78±9**	50±3**

*Примітка: * відмінності значущі порівняно з рівнем гемолізу еритроцитів людини, p<0,05;*

*** відмінності значущі порівняно з рівнем гемолізу контрольних клітин, p<0,05.*

*Note: * differences are significant in comparison with the level of human erythrocytes hemolysis, p<0.05;*

*** differences are significant compared to the level of hemolysis of control cells, p<0.05.*

Таблиця 2. Вплив попередньої обробки фенілгідразином (1,0 ммоль/л) на рівень гіпертонічного гемолізу еритроцитів ссавців при температурі 0°C

Table 2. Effect of phenylhydrazine (1.0 mmol/l) pretreatment on the level of hypertonic hemolysis of mammalian erythrocytes at 0°C

Видоприналежність еритроцитів	Людина	Кролик	Кінь	Бик
Контрольні клітини	68±4***	18±3*	17±2***	10±2***
Клітини, що оброблені фенілгідразином	88±7**	28±2**	37±4**	27±6**

*Примітка: * відмінності значущі порівняно з рівнем гемолізу еритроцитів людини, p<0,05;*

*** відмінності значущі порівняно з рівнем гемолізу контрольних клітин, p<0,05;*

**** відмінності значущі порівняно з рівнем гемолізу контрольних клітин при температурі 37°C, p<0,05.*

*Note: * differences are significant in comparison with the level of human erythrocytes hemolysis, p<0.05;*

*** differences are significant compared to the level of hemolysis of control cells, p<0.05;*

**** differences are significant compared to the level of hemolysis of control cells at 37°C, p<0.05.*

Отримані результати показали, що за умов гіпертонічного шоку при 37°C чутливість клітин людини та бика дещо знижується, кролика – не змінюється, коня – зростає, та у всіх досліджених видів збільшується при 0°C. Звертають на себе увагу еритроцити коня, чутливість яких до гіпертонічного пошкодження значно підвищується (близько 2 разів) при обох температурах, та еритроцити кролика, чутливість яких майже не змінюється.

У табл. 3 відображено рівень гіпертонічного криогемолізу еритроцитів ссавців до та після обробки фенілгідразином. Пошкодження контрольних клітин є видоспецифічним. Еритроцити людини та коня є найбільш чутливими до даного виду стресу. Слід зазначити, що ступінь гемолізу після обробки фенілгідразином стає однаковим для еритроцитів усіх видів досліджуваних ссавців, тобто дія стресу перестає бути видоспецифічною, а стає універсальною.

Отже, ми бачимо, що чутливість еритроцитів ссавців до гіпертонічного стресу та гіпертонічного криогемолізу є видоспецифічною. За даними літератури, вона може визначатися відмінностями в білковому і фосфоліпідному складі досліджуваних еритроцитів. Так, вміст білків груп 2.1–2.3 (анкірини) та білка смуги 3 є кількісно меншим в еритроцитах кролика порівняно з людиною. Вміст білка смуги 3 в клітинах коня нижчий порівняно з клітинами людини, а білок смуги 4.2, який в еритроцитах людини зв'язує цитоплазматичний домен білка смуги 3 та анкірин, відсутній зовсім (Matei et al., 2000). Це може спричинити відмінність у кріпленні спектринового цитоскелету до мембрани за допомогою одного з основних білкових містків, а саме спектрин-анкірин-білок смуги 3 (Xia et al., 2022). Зважаючи на те, що вміст білків, які беруть участь у взаємозв'язку між цитоплазматичною мембраною та спектриною сіткою, у кролика та коня є меншим порівняно з еритроцитами людини, можна припустити більшу лабільність їх цитоскелет-мембранного комплексу, що може зумовлювати меншу чутливість еритроцитів цих тварин до осмотичного та температурного впливу, а саме еритроцитів кролика та коня до гіпертонічного шоку та еритроцитів кролика до гіпертонічного криогемолізу.

Таблиця 3. Вплив попередньої обробки фенілгідразином (1,0 ммоль/л) на рівень гіпертонічного криогемолізу еритроцитів ссавців у середовищі 1,2 моль/л NaCl
Table 3. Effect of phenylhydrazine (1.0 mmol/L) pretreatment on the level of hypertonic cryohemolysis of mammalian erythrocytes in 1.2 mol/L NaCl

Видоприналежність еритроцитів	Людина	Кролик	Кінь	Бик
Контрольні клітини	85±5	28±3*	80±7	35±3*
Клітини, що оброблені фенілгідразином	66±8**	58±5**	64±4**	52±6**

Примітка: * відмінності значущі порівняно з рівнем гемолізу еритроцитів людини, $p < 0,05$;

** відмінності значущі порівняно з рівнем гемолізу контрольних клітин, $p < 0,05$.

Note: * differences are significant in comparison with the level of human erythrocytes hemolysis, $p < 0.05$;

** differences are significant compared to the level of hemolysis of control cells, $p < 0.05$.

За фосфоліпідним складом серед досліджуваних еритроцитів вирізняються еритроцити бика, мембрана яких містить значну кількість сфінгомеліну, на відміну від еритроцитів інших досліджуваних ссавців, де переважаючим є фосфатидилхолін (Florin-Christensen et al., 2001). Відомо, що сфінгомелінін тісно пов'язаний з утворенням ліпідних мікродоменів, у межах яких розташована переважна більшість білкових структур мембрани (Koumanov et al., 2005; Kraft, 2017). За низької температури насичені гідрофобні ланцюги сфінгомеліну створюють високоупорядковану ригідну структуру. Забезпечуючи стабільність мембранних білків, вони усталюють структуру плазматичної мембрани. В еритроцитах, багатих на ці фосфоліпіди (наприклад, еритроцити вівці), спостерігається фазовий перехід гель/рідкокристалічна фаза при температурах близько 35°C, в той час як еритроцити людини не мають виражених фазових переходів (Shaw et al., 2012; Färber, Westerhausen, 2022). Можливо саме ця особливість фосфоліпідного складу визначає значну різницю рівня гіпертонічного пошкодження еритроцитів бика при 0 та 37°C на відміну від інших ссавців.

Обробка еритроцитів фенілгідразином призводить до зміни спектринової мережі еритроцитарної мембрани та зниження здатності клітин деформуватися (Ramot et al., 2008; Ivanov, Raarvanova, 2022). Фенілгідразин окислює основний цитозольний білок, гемоглобін, спричиняючи атаку вільних радикалів і денатурацію гемоглобіну та пошкодження деяких інших мембранних білків меншою мірою. Альфа-гемоглобінові ланцюги (глобіни) денатурованого гемоглобіну вибірково зв'язуються зі спектрином мембранного каркасу, що призводить до утворення тілець Гейнца та зниження здатності клітин до деформації. На додаток до цього, вплив фенілгідразину на людські еритроцити призводить до прямого окисного пошкодження спектрину (Ramot et al., 2008). Результати роботи (Berger, 2007) показують, що індуковане фенілгідразином окислювальне ушкодження еритроцитів із дискретним утворенням тілець Гейнца викликає фокальну ригідність мембрани, що вказує на руйнування ділянок прикріплення спектрину до білка смуги 3. Це передбачає можливу модифікацію інших цитоскелетних білків, на додаток до спектрину.

Вплив фенілгідазину саме на білкову частину цитоскелет-мембранного комплексу еритроцитів дозволяє дискутувати на тему ролі останнього у реакції клітин на гіпертонічний стрес та гіпертонічний криогемоліз. Як видно з отриманих результатів, в умовах гіпертонічного шоку навіть після обробки фенілгідазином зберігається видоспецифічність реакції еритроцитів різних видів ссавців – ступінь гемолізу модифікованих еритроцитів різна. В умовах криогемолізу – інша ситуація – спостерігаємо приблизно однаковий рівень лізису еритроцитів різних видів ссавців, тобто видоспецифічність не зберігається. Виходячи з отриманих результатів, можна зробити припущення про значну роль цитоскелет-мембранного комплексу в реакції клітин на пошкодження в умовах криогемолізу.

Вивченню ролі компонентів мембрани еритроцитів у механізмі криогемолізу присвячені роботи (Green et al., 1981) та (Green et al., 1983). Автори дійшли висновку, що спектрин-актинова система цитоскелету, включаючи її взаємодію з фосфоліпідами, є ключем до явища гіпертонічного криогемолізу. У роботі (Takahashi et al., 1986) були продемонстровані морфологічні зміни при охолодженні клітин до 10°C в гіпертонічному розчині. При цьому спостерігався швидкий перехід від сплющеної дискоїдної форми до сфероцитів та поява «зморшок» на поверхні мембрани. Такі зміни свідчать про порушення зв'язку між цитоскелетною мережею та мембранним бішаром мембрани. Також було показано зростання впорядкованості мембрани за рахунок осмотичного напруження та створення доменів, що змінювало взаємодію білкових та фосфоліпідних компонентів мембрани. Відомо, що гіпертонічний криогемоліз використовується в якості тесту на спадковий сфероцитоз (Streichman et al., 1990). Показано, що чутливість до криогемолізу у еритроцитів пацієнтів зі спадковим сфероцитозом виникає через аномалії білків мембран еритроцитів, які беруть участь у вертикальних взаємодіях між цитоскелетом і ліпідним бішаром, зокрема анкірину, α - і β -спектрину, білків смуг 3 і 4.2 (An, Mohandas, 2008). Сили, що діють на мембрану та цитоскелет під час осмотичних і температурних змін, виявляють дефекти в цих білках, що призводить до нестабільності мембранної системи та подальшого гемолізу. Передбачається, що різка реорганізація мембрани у процесі охолодження може відігравати ключову роль у феномені криогемолізу.

Висновки

Отже, обробка фенілгідазином змінює чутливість еритроцитів деяких із досліджених ссавців до гіпертонічного шоку та усіх досліджених ссавців до гіпертонічного криогемолізу. Але тільки у випадку криогемолізу зміни призводять до зникнення видоспецифічності реакції еритроцитів на стресову дію. На підставі цього можна зробити припущення, що білкова складова цитоскелет-мембранного комплексу відіграє значну роль у реакції еритроцитів ссавців на дію гіпертонічного криогемолізу. Можна припустити, що в нативних клітинах гіпертонічне середовище спричиняє зміну деяких білків скелетної мережі таким чином, що їхня нормальна адаптація до температурних змін стає неможливою, крім того значні зміни відбуваються у взаємодії мембранних білків та оточуючих їх фосфоліпідів, що призводить до руйнування клітини. Що стосується гіпертонічного шоку, ймовірно інші параметри клітини, можливо ліпідна складова мембрани, відіграють провідну роль у пошкодженні. Тому модифікація білкової частини цитоскелет-мембранного комплексу зберігає видоспецифічність реакції клітин на стрес.

References

- An X., Mohandas N. (2008). Disorders of the red cell membrane. *British Journal of Haematology*, 141(3), 367–375. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07091.x>
- Arduini A., Storto S., Belfiglio M. et al. (1989). Mechanism of spectrin degradation induced by phenylhydrazine in intact human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 979(1), 1–6. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(89\)90515-4](https://doi.org/10.1016/0005-2736(89)90515-4)
- Benga G. (2013). 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. *European Biophysics Journal*, 42(1), 33–46. <https://doi.org/10.1007/s00249-012-0868-7>
- Benga G., Cox G. (2022). Light and scanning electron microscopy of red blood cells from humans and animal species providing insights into molecular cell biology. *Front. Physiol.*, 13, 838071. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.838071>
- Berger J. (2007). Phenylhydrazine haematotoxicity. *Journal of Applied Biomedicine*, 5(3), 125–130, <http://dx.doi.org/10.32725/jab.2007.017>

- Bojic S., Murray A., Bentley B.L. et al. (2021). Winter is coming: the future of cryopreservation. *BMC Biology*, 19, 56. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-00976-8>
- Chabanenko O., Yershova N., Shpakova N. (2020). Adequacy of posthypertonic shock model to real cryopreservation conditions during deglycerolization of erythrocytes. Proceedings of the 57th annual meeting of the Society for Cryobiology «CRYO-2020». 21–23 July 2020, USA. *Cryobiology*, 97, 276. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.10.106> (in Ukrainian)
- Färber N., Westerhausen C. (2022). Broad lipid phase transitions in mammalian cell membranes measured by Laurdan fluorescence spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes*, 1864(1), 183794. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183794>
- Florin-Christensen J., Suarez C.E., Florin-Christensen M. et al. (2001). A unique phospholipid organization in bovine erythrocyte membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98(14), 7736–7741. <https://doi.org/10.1073/pnas.131580998>
- Green F.A., Jung C.Y., Cuppoletti J., Owens N. (1981). Hypertonic cryohemolysis and the cytoskeletal system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 648(2), 225–230. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(81\)90038-9](https://doi.org/10.1016/0005-2736(81)90038-9)
- Green L.A., Hui H.L., Green F.A., et al. (1983). The role of choline phospholipids in hypertonic cryohemolysis. *Cryobiology*, 20(1), 25–29. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(83\)90055-X](https://doi.org/10.1016/0011-2240(83)90055-X)
- Ivanov I.T., Paarvanova B.K. (2022). Segmental flexibility of spectrin reflects erythrocyte membrane deformability. *Gen Physiol Biophys*. 41(2), 87–100. https://doi.org/10.4149/gpb_2022004
- Ivanov I.T., Paarvanova B.K., Tacheva B.B., Slavov T. (2020). Species-dependent variations in the dielectric activity of membrane skeleton of erythrocytes. *Gen Physiol Biophys*., 39(6), 505–518. https://doi.org/10.4149/gpb_2020034
- Jang T.H., Park S.C., Yang J.H. et al. (2017). Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative Medicine Research*, 6(1), 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2016.12.001>
- Koumanov K.S., Tessier C., Momchilova A.B. et al. (2005). Comparative lipid analysis and structure of detergent-resistant membrane raft fractions isolated from human and ruminant erythrocytes. *Comparative Study Arch Biochem Biophys*, 434(1), 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.10.025>
- Kraft M.L. (2016). Sphingolipid organization in the plasma membrane and the mechanisms that influence it. *Front Cell Dev Biol*., 4, 154. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00154>
- Matei H., Frentescu L., Benga Gh. (2000). Comparative studies of the protein composition of red blood cell membranes from eight mammalian species. *J. Cell. Mol. Med.*, 4(4), 270–276. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2000.tb00126.x>
- Ramot Y., Koshkaryev A., Goldfarb A. et al. (2008). Phenylhydrazine as a partial model for beta-thalassaemia red blood cell hemodynamic properties. *Br. J. Haematol.*, 140(6), 692–700. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06976.x>
- Shaw K.P., Brooks N.J., Clarke J.A. et al. (2012). Pressure–temperature phase behaviour of natural sphingomyelin extracts. *Soft Matter*, 8(4), 1070–1078. <http://dx.doi.org/10.1039/c1sm06703f>
- Shpakova N.M. (2010). Temperature and osmotic sensitivity of red blood cells of different mammalian species. *Animal Biology*, 12(1), 382–391. (in Ukrainian)
- Shpakova N.M., Ershov S.S., Nipot E.Ye. (2010). Hypertonic cryohemolysis of mammalian erythrocytes in electrolyte and non-electrolyte media. *Animal Biology*, 12(2), 524–530. (in Ukrainian)
- Streichman S., Gesheidt Y., Tatarsky I. (1990). Hypertonic cryohemolysis: a diagnostic test for hereditary spherocytosis. *American Journal of Hematology*, 35(2), 104–109. <https://doi.org/10.1002/ajh.2830350208>
- Takahashi T., Noji S., Erbe E.F. et al. (1986). Cold shock hemolysis in human erythrocytes studied by spin probe method and freeze-fracture electron microscopy. *Biophys J.*, 49(2), 403–410. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(86\)83650-5](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(86)83650-5)
- Varga A., Matrai A.A., Barath B. et al. (2022). Interspecies diversity of osmotic gradient deformability of red blood cells in human and seven vertebrate animal species. *Cells*, 11(8), 1351. <https://doi.org/10.3390/cells11081351>
- Xia X, Liu S., Zhou Z.H. (2022). Structure, dynamics and assembly of the ankyrin complex on human red blood cell membrane. *Nature Structural & Molecular Biology*, 29(7), 698–705. <https://doi.org/10.1038/s41594-022-00779-7>

Changes in the sensitivity of mammalian erythrocytes to hypertonic shock and cryohemolysis under the pretreatment by phenylhydrazine O.E. Nipot, N.A. Yershova, S.S. Yershov, O.O. Chabanenko, N.M. Shpakova

The effect of pretreating mammalian erythrocytes with phenylhydrazine on their sensitivity to hypertonic shock and hypertonic cryohemolysis was investigated. The results of the experiments showed that the sensitivity of intact mammalian erythrocytes to these stress effects is species-specific. It can be determined by differences in the protein and phospholipid composition of the erythrocytes studied. Human erythrocytes are more sensitive to hypertonic shock at 37 and 0°C, and human and equine erythrocytes are more sensitive to hypertonic cryohemolysis. It was found that under hypertonic shock conditions, the degree of lysis of rabbit erythrocytes at 37°C and 0°C is the same, whereas that of bovine red blood cells is significantly different. Phenylhydrazine treatment alters the sensitivity of erythrocytes to hypertonic shock of some studied mammals and to hypertonic cryohemolysis in all of them. The results showed that under hypertonic shock at 37°C, the sensitivity of human and bovine cells decreases, that of rabbit cells does not change, that of horse cells increases; at 0°C, it increases in all species studied. It should be noted that the sensitivity of horse erythrocytes to hypertonic injury increases significantly (almost twice) at 0 and 37°C, whereas the sensitivity of rabbit erythrocytes does not change at 37°C. Under conditions of hypertonic cryohemolysis, the degree of cell lysis after treatment with phenylhydrazine becomes the same for erythrocytes of all mammalian species studied, i.e. the effect of stress becomes universal and not species-specific. Taking into account the data on the effect of phenylhydrazine only on the protein part of the erythrocyte cytoskeleton-membrane complex, it can be assumed that the protein component of the cytoskeleton is decisive in the response of mammalian erythrocytes to the effect of hypertonic cryohemolysis. As for hypertonic shock, since the species-specificity of the mammalian erythrocyte response to stress is preserved after phenylhydrazine action on membrane proteins, other structures, such as the lipid component of the membrane, could determine the sensitivity of erythrocytes to this type of stress.

Key words: *mammalian erythrocytes, phenylhydrazine, hypertonic shock, hypertonic cryohemolysis, cytoskeleton.*

Cite this article: Nipot O.E., Yershova N.A., Yershov S.S., Chabanenko O.O., Shpakova N.M. Changes in the sensitivity of mammalian erythrocytes to hypertonic shock and cryohemolysis under the pretreatment by phenylhydrazine. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series "Biology", 2023, 40, 19–25.* <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2023-40-2> (in Ukrainian)

About the authors:

O.E. Nipot – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Pereyaslavka Street, 23, Kharkiv, Ukraine, 61016, nipotel71@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2877-8896>

N.A. Yershova – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Pereyaslavka Street, 23, Kharkiv, Ukraine, 61016, ershbas@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9332-6752>

S.S. Yershov – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Pereyaslavka Street, 23, Kharkiv, Ukraine, 61016, erisovsupei@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6136-1825>

O.O. Chabanenko – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Pereyaslavka Street, 23, Kharkiv, Ukraine, 61016, chabanenkoolena@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-1977-3495>

N.M. Shpakova – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Pereyaslavka Street, 23, Kharkiv, Ukraine, 61016, starling.nataly@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-0148-7522>

Received: 15.03.2023 / Revised: 18.04.2023 / Accepted: 24.05.2023