

## Погрешности при определении относительного количества негемолизировавших эритроцитов в криобиологических экспериментах

UDC 57.043.085.2:611.018.51

V.D. ZINCHENKO\*, I.A. BURYAK, E.L. VOLOVELSKAYA

## Errors when Determining Relative Number of Non-Hemolyzed Erythrocytes in Cryobiological Experiments

Установлены требования к проведению эксперимента, при соблюдении которых величина доверительного интервала для сохранности криоконсервированных эритроцитов одного донора составляет 1,5–6,0% с доверительной вероятностью 0,95.

**Ключевые слова:** эритроциты, криоконсервирование, гемолиз, погрешности экспериментов.

Встановлено вимоги до проведення експерименту, при дотриманні яких величина довірчого інтервалу для збереженості криоконсервованих еритроцитів одного донора складає 1,5–6,0% з довірчою ймовірністю 0,95.

**Ключові слова:** еритроцити, криоконсервування, гемоліз, похибки експериментів.

Experimental requirements, during meeting of which the value of confidence interval for the integrity of cryopreserved erythrocytes of a donor makes 1.5–6.0% with 0.95 confidence probability, have been established.

**Key-words:** erythrocytes, cryopreservation, hemolysis, experimental errors.

Уровень гемолиза эритроцитов после криоконсервирования является одним из показателей их сохранности. При его определении существуют следующие причины погрешностей:

1. Погрешности, связанные с перемешиванием суспензии эритроцитов перед экспериментом. После установки пробирки с суспензией клеток в штатив начинается седиментация, вследствие которой количество эритроцитов в разных слоях суспензии будет разное. Суспензию перед опытом следует тщательно перемешивать.

2. Погрешности, возникающие при дозированном отборе пробы. Часть суспензии клеток удерживается поверхностными силами на кончике и стенках дозатора. Следует учитывать, что для плотных образцов суспензии характерна более высокая погрешность. Для уменьшения погрешности следует использовать разбавленную суспензию эритроцитов. Разведение исходного образца суспендирующим раствором может быть проведено достаточно точно и легко учитывается в расчетах. Важно использовать один и тот же дозатор при отборе дозированного количества суспензии.

3. Погрешности, связанные с температурой исходного образца перед отбором пробы, поскольку от температуры зависят вязкость и объем образца

Level of erythrocyte hemolysis after cryopreservation is the one of the indices of their survival. The following reasons of errors exist during its determination:

1. Errors associated with mixing of erythrocyte suspension before the experiment. Sedimentation begins after fixing the tube with cell suspension in the tube adapter. Due to this the number of erythrocytes in various layers of suspension will be different. Before the experiment the suspension should be intensively mixed.

2. Errors appearing at a dosed sampling. Part of cell suspension is kept with surface forces on the tip and sides of a dispenser. It should be considered that for dense suspension samples the higher error is characteristic. To minimize the error the diluted suspension of erythrocytes should be used. Dilution of initial sample with suspending solution may be performed quite accurately and it is easy to be taken into account during counting. It is important to use the same dispenser when taking the dosed quantity of a suspension.

3. Errors associated with the temperature of original sample before sampling, since blood sample viscosity and volume are temperature-dependent. To reduce the error of this type the samples should be selected at the same sample temperature.

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38  
(057) 373-31-41, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:  
cryo@online.kharkov.ua

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

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3141, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

крови. Для снижения погрешностей этого типа следует отбирать пробы при одной температуре образца.

4. Погрешности, возникающие при удалении надосадочной жидкости после центрифугирования суспензий. Эту процедуру следует проводить таким образом, чтобы избежать затягивания части осажженных клеток в пипетку.

5. Погрешности, связанные со спектрофотометрическими измерениями экстинкции. При проведении серии экспериментов важно использовать одну и ту же кювету, причем измерения желательнее проводить при одном включении прибора. Это особенно важно при работе со спектральными приборами старых типов, поскольку при их выключении и повторном включении не исключаются некоторые изменения их параметров.

Цель данной работы – экспериментальная оценка точностных характеристик определения относительного количества негемолизировавших эритроцитов человека в криобиологических экспериментах с использованием типовых подходов и оборудования, имеющегося в обычных лабораторных условиях.

#### **Материалы и методы**

Все эксперименты были проведены согласно вышеописанным требованиям.

Эритроциты получали из донорской крови человека. От плазмы их трижды отмывали физиологическим раствором с помощью центрифугирования в течение 15 мин при 800 g.

Для криоконсервирования эритроцитов за основу были взяты методы, описанные в [3, 4]. Данные методы позволяют получать достаточно высокий процент негемолизировавших эритроцитов после криоконсервирования. При оценке относительной погрешности таких результатов приходится сравнивать значения, близкие к 90%. Представляет интерес оценить относительную погрешность определения количества негемолизировавших эритроцитов в группах экспериментов с другими значениями измеряемой величины. Для этого метод криоконсервирования [4] был модернизирован таким образом, чтобы снизить количество негемолизировавших эритроцитов после замораживания-оттаивания. Количество декстрана в криозащитном растворе уменьшали до 5%, снижая этим его криозащитную эффективность. Такой криозащитный раствор обеспечивает количество негемолизировавших эритроцитов после замораживания-оттаивания в пределах от 40 до 60%, причем эффективность его криозащитного действия оказывается различной для эритроцитов разных доноров. В работе оценивали относительные погрешности при определении количества негемолизировавших

4. Errors appearing during supernatant liquid elimination after centrifugation of a suspension. This procedure should be carried out to avoid the intake of a part of precipitated cells to a pipette.

5. Errors associated with the spectrophotometric measurements of an extinction. It is important to use the same cuvette during the series of experiments, moreover the measurements are preferable to be performed at a single switching-on of the device. This is especially important when working with the spectral devices of the old-style types, because some parametric variations are not excluded during their switching-off and reset.

The research aim is the experimental estimation of accurate characteristics of the determination of relative number of human non-hemolyzed erythrocytes in cryobiological experiments with using the typical approaches and equipments available at traditional laboratory conditions.

#### **Materials and methods**

All experiments were carried-out according to the above described requirements.

Erythrocytes were derived from human donor's blood. They were thrice washed-out of plasma with physiological solution by centrifugation for 15 min at 800g.

The reported methods [3, 4] were laid to the base for cryopreservation of erythrocytes. These methods allow the obtaining of quite high percentage of non-hemolyzed erythrocytes after cryopreservation. When estimating a ratio error of these results the values having a slight difference between each other have to be compared. For us it is of interest to estimate a ratio error when determining the number of non-hemolyzed erythrocytes in experimental groups with strongly differing values of the value under measurement. With this aim the cryopreservation method [4] was modified in such a way to reduce the number of non-hemolyzed erythrocytes after freeze-thawing. The amount of dextran in cryoprotective medium was reduced down to 5%, thereby decreasing its cryoprotective efficiency. This cryoprotective solution provides the amount of non-hemolyzed erythrocytes after freeze-thawing within the limit form 40 to 60%, moreover the efficiency of its cryoprotective effect occurs to be different for erythrocytes of various donor's. In the paper we estimated a ratio errors when determining the number of non-hemolyzed erythrocytes in groups of cells of various donors after their freeze-thawing with the mentioned cryoprotective solution.

Erythromass was mixed in 1:1 v/v ratio correlation with cryoprotective solution, containing 2% glucose, 7% sucrose, 0.3% NaCl, 5% dimethylsulfoxide and 5% dextrane with 10,000 molecular weight. After incubation in cryoprotective medium at room

эритроцитов в группах клеток различных доноров после их замораживания-оттаивания с указанным криозащитным раствором.

Эритромассу смешивали в объемном соотношении 1:1 с криозащитным раствором, содержащим глюкозу (2%), сахарозу (7%), NaCl (0,3%), диметилсульфоксид (5%) и декстран с молекулярной массой 10000 (5%). После инкубирования в криозащитной среде при комнатной температуре (22°C) в течение 40 мин образцы объемом 1 мл в пластиковых контейнерах замораживали погружением в жидкий азот. Замороженные образцы отогревали на водяной бане при 40°C, далее отмывали эритроциты, медленно приливая к оттаявшим клеткам физиологический раствор в соотношении 1:10 при 37°C. После этого суспензию центрифугировали при вышеописанных условиях и удаляли надосадок. Указанную процедуру повторяли еще два раза.

Относительное количество негемолизовавшихся эритроцитов определяли по выходу гемоглобина из клеток [5]. Для этого отбирали аликвоты объемом 100 мкл после первого разбавления суспензии деконсервированных клеток отмывочным раствором и после трехкратной отмывки клеток физиологическим раствором. Каждую аликвоту вносили в пробирку, содержащую 1,9 мл дистиллированной воды и 0,1 мл 0,3% тритона X-100, центрифугировали и измеряли пропускание света  $T$  в гемолизатах. Измерения проводили на спектрофотометре СФ – 4А на длине волны 543 нм.

Относительное количество негемолизовавшихся эритроцитов  $x$  в каждом образце рассчитывали по формуле

$$x = \frac{\lg T_2}{\lg T_1} \times 100\% , (1)$$

где  $T_1$  – пропускание света гемолизатом клеток, отобранных после первого разбавления суспензии деконсервированных клеток отмывочным раствором;  $T_2$  – пропускание света гемолизатом клеток, трижды отмывтых физиологическим раствором. Величина  $T_1$  отражает суммарное количество гемоглобина в суспензии эритроцитов;  $T_2$  – количество гемоглобина в негемолизовавшихся клетках.

В экспериментах использовали эритроциты 8 доноров. Из образца крови от каждого донора готовили по 4-5 параллельных проб и методами математической статистики оценивали погрешности экспериментальных результатов [1, 2]. Для эритроцитов каждого донора рассчитывали: среднее арифметическое значение относительного количества негемолизовавшихся клеток

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i ; \quad (2)$$

temperature of 22°C for 40 min the samples of 1 ml volume in plastic containers were frozen by plunging into liquid nitrogen. Frozen samples were warmed on water bath at 40°C, then the erythrocytes were washed-out by slowly filling the physiological solution to the thawed cells in 1:10 ratio at 37°C. Afterwards the suspension was centrifuged at the described above conditions and the supernatant was removed. The stated procedure was repeated twice.

Relative number of non-hemolyzed erythrocyte was determined on hemoglobin release out of the cells [5]. With this aim 100  $\mu$ l aliquots were selected after the first suspension dilution of frozen-thawed cells with washing-out solution and after three-fold washing-out of the cells by physiological solution. Each aliquot was placed into a vial, containing 1.9 ml distilled water and 0.1 ml 0.3% X-100 triton, centrifuged and T light transmission was measured in the hemolysates. Measuring was conducted with CF-4A spectrophotometer at 543 nm wave length.

The relative number of non-hemolyzed erythrocyte  $x$  in each sample was counted according to the formula:

$$x = \frac{\lg T_2}{\lg T_1} \times 100\% , (1)$$

where  $T_1$  – light transmission by cell hemolysate, selected after the first suspension dilution of frozen-thawed cells with washing-out solution;

$T_2$  - light transmission by cell hemolysate, thrice washed-out with physiological solution.  $T_1$  value represents total hemoglobin quantity in erythrocyte suspension;  $T_2$  – hemoglobin quantity in non-hemolyzed cells.

In the experiments the erythrocytes of 8 donors were used. From the blood sample of each donor 4-5 parallel tests were prepared and errors of the experimental results were estimated [1,2] by mathematical statistics methods. For the erythrocytes of each donor there were calculated: arithmetic mean value of relative number of non-hemolyzed cells

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i ; \quad (2)$$

Dispersion of mean value

$$S_x^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1} ; \quad (3)$$

Sampling mean standard (mean-square deviation)

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{S_x^2}{n}} ; \quad (4)$$

where  $n$  – number of measurements  
Value of confidence interval

$$\varepsilon_{\beta} = t(p, f) S_{\bar{x}} , (5)$$

Результаты экспериментов по определению относительного количества негемолизировавших эритроцитов  
и результаты статистической обработки

Experimental results for the determination of relative number of non-hemolyzed erythrocytes and those of statistical processing

Номер донора Donor's number	Выбор значений относительного количества негемолизировавших эритроцитов в параллельных пробах $x_i$ , % Value sampling of relative number of non-hemolyzed erythrocytes in the parallel tests $x_i$ , %	Значение выборочного стандарта среднего $S_x$ , % Sampling standard mean value $S_x$ , %	Относительное количество негемолизировавших эритроцитов $\bar{x} \pm \varepsilon_\beta$ , % Relative number of non-hemolyzed erythrocytes $\bar{x} \pm \varepsilon_\beta$ , %
1	63,67 60,30 60,85 60,71 54,98	1,41	60,1±3,9
2	53,52 54,36 55,62 53,95 56,25	0,52	54,7±1,5
3	41,89 40,76 48,44 40,75	1,85	43,0±5,9
4	51,21 54,58 58,69 51,70 57,34	1,48	54,7±4,1
5	60,10 63,58 69,08 65,65	1,88	64,6±6,0
6	40,95 45,15 49,02 47,50	1,71	44,6±4,8
7	66,35 68,03 63,46 61,18 66,78	1,25	65,2±3,5
8	42,86 42,45 48,14 47,60 49,71	1,47	46,2±4,1

дисперсию среднего значения

$$S_x^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}; \quad (3)$$

выборочный стандарт среднего (среднеквадратичное отклонение)

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{S_x^2}{n}}, \quad (4)$$

где  $n$  – число измерений;  
величину доверительного интервала

$$\varepsilon_\beta = t(p, f) S_{\bar{x}}, \quad (5)$$

где  $t$  – критерий Стьюдента, зависящий от уровня значимости  $p$  (или от доверительной вероятности  $(\beta=1-p)$ ), и от числа степеней свободы дисперсии  $f=n-1$ .

where  $t$  – Student's test criterion, dependent on  $p$  significance level (or confidence probability  $\beta=1-p$ ) and on the number of dispersion freedom degrees  $f=n-1$ . Then they were calculated the same values on the experimental results with erythrocytes from different donors.

### Results and discussion

Table shows the values  $x$  in parallel tests, means for each donor the  $\bar{x}$  values, mean-square deviations and confidence intervals at  $p=0.05$  significance level.

Proceeding from the data of the Table for 8 donors, mean values of relative number of non-hemolyzed erythrocyte  $\bar{x}=54.1\%$ , mean-square deviation  $S_x=3.1\%$  and confidence interval value  $\varepsilon_\beta=7.4\%$  were calculated.

As the table demonstrates mean-square deviation values  $S_x$  varied within the range of 0.52-1.88% for

## Результаты и обсуждение

В таблице приведены значения  $x$  в параллельных пробах, средние для каждого донора значения  $\bar{x}$ , среднеквадратичные отклонения и доверительные интервалы при уровне значимости  $p=0,05$ .

Исходя из данных, приведенных в таблице для 8 доноров, были вычислены среднее значение относительного количества негемолизовавших эритроцитов  $\bar{x}=54,1\%$ , среднеквадратичное отклонение среднего  $S_{\bar{x}}=3,1\%$  и величина доверительного интервала  $\epsilon_b=7,4\%$ .

Как видно из таблицы, значения среднеквадратичного отклонения для эритроцитов одного донора колеблются в пределах 0,52-1,88%, а значения доверительного интервала – 1,5-6,0%. Такие точностные характеристики в эксперименте по определению относительного количества негемолизовавших эритроцитов измерением гемолиза могут быть получены при соблюдении вышеописанных требований к подготовке образцов крови и проведению исследований.

## Выводы

Приведены требования к процедуре определения относительного количества негемолизовавших эритроцитов в криобиологических экспериментах. При соблюдении указанных требований к подготовке образцов и проведению измерений относительное количество негемолизовавших эритроцитов может быть определено в доверительном интервале, не превышающем 6%, с доверительной вероятностью 0,95.

## Литература

1. Лакин Г.Ф. Биометрия.– М.: Высш. школа, 1980.– 293 с.
2. Чарыков А.К. Математическая обработка результатов химического анализа.– Л.: Химия.– 1984.– 168 с.
3. Пат. №13845. Україна, МПК А 01N1/02. Спосіб кріоконсервування еритроцитів / В.В. Рамазанов, О.О. Олійник, С.В. Меліхова, І.В. Бондаренко, В.А. Бондаренко. Заявлено 3.11.2005. Публ. 17.04.2006. Бюл. №4.
4. Пат. №18571. Україна, МПК А 01N1/02. Спосіб кріоконсервування еритроцитів / С.Л. Воловельська, І.А. Мусіна, В.Д. Зінченко, В.В. Рамазанов, В.А. Бондаренко. Заявлено 10.05.2006. Публ. 15.11.2006. Бюл. № 11.
5. Wagner C.T., Burnett M.B., Livesey S.A., Connor J. Red blood cell stabilization reduces the effect of cell density on recovery following cryopreservation// Cryobiology.– 2000.– Vol.41, N3.– P. 178-194.

Поступила 05.06.07

donor erythrocytes and 1.5-6.0% for the confidence interval value. These characteristics of accuracy in the experiment for determining the relative number of non-hemolyzed erythrocytes by measuring the hemolysis may be obtained when meeting the described above requirements for blood sample preparation and research performance.

## Conclusions

There were presented the demands to determination procedure of relative number of non-hemolyzed erythrocytes in cryobiological experiments. When meeting the stated demands to the sample preparation and measuring, the relative number of non-hemolyzed erythrocytes may be determined within the confidence interval, not exceeding 6% and with 0.95 confidence probability.

## References

1. Lakin G.F. Biometry.– Moscow: Vyscha shkola, 1980.– 293 p.
2. Charykov A.K. Mathematic processing of chemical analysis results. – Leningrad: Khimiya. – 1984. – 168 p.
3. Patent № 13845 Ukraine, IPC A 01 N 1/02. Cryopreservation method of erythrocytes / Ramazanov V.V., Olijnyk O.O., Melikhova S.V., Bondarenko I.V., Bondarenko V.A. Applied 03.11.2005. Publ. 17.04.2006. Bul. №4.
4. Patent № 18571 Ukraine, IPC A 01 N 1/02. Cryopreservation method of erythrocytes / Volovelskaya E.L., Musina I.A., Zinchenko V.D., Ramazanov V.V., Bondarenko V.A. Applied 10.05.2006. Publ. 15.11.2006. Bul. №11.
5. Wagner C.T., Burnett M.B., Livesey S.A., Connor J. Red blood cell stabilization reduces the effect of cell density on recovery following cryopreservation// Cryobiology.– 2000.– Vol.41, N3.– P.178 – 194.

Accepted in 05.06.07