

УДК 611.018.53:618.48]:57.086.13:57.022:612.111-084.1«46»

В.В. Ломако

Вплив кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові та інверсії світлового режиму на стан еритроцитів крові щурів різного віку

UDC 611.018.53:618.48]:57.086.13:57.022:612.111-084.1«46»

V.V. Lomako

Effect of Cryopreserved Cord Blood Nucleated Cells and Shift of Light-Dark Cycle on Erythrocytes of Rats of Different Age

Ключові слова: трансформація еритроцитів, кріоконсервована кордова кров, інверсія світлового режиму, вік, щури.

Ключевые слова: трансформация эритроцитов, криоконсервированная кордовая кровь, инверсия светового режима, возраст, крысы.

Key words: erythrocytes transformation, cryopreserved cord blood, shift of light-dark cycle, age, rats.

В останні роки кріоконсервовані складові кордової крові та стовбурові клітини успішно використовуються у клінічній практиці. У зв'язку з особливостями життя і професійної діяльності (нічні зміни, трансконтинентальні перельоти тощо) сучасна людина все частіше стикається з інверсією світлового режиму (ICP) (циркадний десинхроноз). Відомо, що тривала неузгодженість (десинхронізація) між ендо- та екзогенними циркадними ритмами сприяє розвитку функціональних порушень в організмі, особливо під час старіння [2]. Ми припустили, що введення кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові (ЯВК КК), завдяки високому рівню збереження їх функціональної повноцінності [1] і унікальним властивостям, може певною мірою сприяти нівелюванню негативних проявів впливу інверсії світлового режиму на організм. Стан високоспеціалізованих клітин крові, зокрема еритроцитів, є інформативним діагностично-прогностичним показником рівня адаптивних реакцій організму.

Мета роботи – визначення окремих та комбінованих ефектів введення ядровмісних клітин кордової крові та інверсії світлового режиму на стан еритроцитів крові молодих і старих щурів.

Експерименти проводили відповідно до вимог Комітету з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Роботу виконували на молодих (6–7 місяців) і старих (18–20 місяців) самцях білих безпородних щурів, яких

Recently, cryopreserved components of cord blood and stem cells have been widely used in clinical practice. Due to the peculiarities of life and professional activity (night shifts, transcontinental flights, etc.), modern people are more often exposed to the shift of light-dark cycle (SLDC) (circadian desynchronization). It is known that prolonged desynchronization between endo- and exogenous circadian rhythms contributes to the development of functional disorders in organism, especially during ageing [3]. We have suggested that an injection of cryopreserved cord blood nucleated cells (CBNCs), due to a high level of preservation of their functional completeness [1] and unique properties, can cancel a negative effect of the shift of light-dark cycle. The state of highly specialized blood cells, in particular erythrocytes, is an informative diagnostic and prognostic index of the level of adaptive responses of an organism.

The research aim was to determine the single and combined effects of injection of cryopreserved cord blood nucleated cells and shift of light-dark cycle on the state of erythrocytes of young and aged rats.

All the experiments were performed in compliance with the requirements of the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine. They were performed in young (6–7-month-old) and aged (18–20-month-old) male outbred rats kept prior to the experiment under animals' house conditions with natural light and a standard diet *ad libitum*.

Відділ кріофізіології, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

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

Адреса для кореспонденції:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: victoria0regia@gmail.com

Address for correspondence:

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: victoria0regia@gmail.com

Надійшла 14.02.2019

Прийнята до друку 14.11.2019

Received February, 14, 2019

Accepted November, 14, 2019

© 2019 V.V. Lomako. 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.

до початку експерименту утримували в умовах віварію за природного світлового режиму та на стандартному раціоні *ad libitum*. Здійснювали ІСР шляхом одноразового збільшення тривалості світлового періоду на 12 годин (світловий період складав 24 години) [7]. За 7 діб до моделювання ІСР щурам внутрішньочеревно вводили 1,0 мл кріоконсервованої суспензії ЯВК КК людини в аутологічній плазмі [1], вміст стовбурових CD34⁺-клітин становив $2-4 \times 10^5$.

Забір крові проводили після декапітації тварин одночасно для біохімічних, морфологічних та інших досліджень. Тварин кожного віку розділили на експериментальні групи ($n = 5$ у кожній): інтактний контроль; щури з ІСР; після введення ЯВК КК і після моделювання ІСР на тлі попереднього введення ЯВК КК (ЯВК КК + ІСР).

Трансформацію еритроцитів оцінювали методом визначення їх розподілу у популяції за індексом сферичності (ІС), який на підставі моделі осмотичного гемолізу визначали з кривих осмотичної крихкості (ОК) [6]. Криві ОК отримували за допомогою методу малокутового розсіювання світла на приладі, розробленому в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Вивчали залежність інтенсивності розсіювання світла суспензією еритроцитів (під кутом 90° у напрямку до падаючого променя) від кількості клітин у ній. Для визначення рівня ОК еритроцитів у вимірювальну ємність, яка містила 3,0 мл розчину NaCl різної концентрації (від 0,15 до 0,05 моль/л), додавали 30 мкл еритромаси, отриманої після відстоювання крові та аспірації плазми. Потім визначали відсоток збережених клітин. Усі дослідження проводили за температури 20°C . Значення ІС відповідали кратності збільшення об'єму еритроцита за умов його трансформації у сфероцит. За співвідношенням нормальних (дискоцити) та оборотно і необоротно змінених форм еритроцитів [3] розраховували інтегральні показники – індекси трансформації еритроцитів [4]: трансформації – $(\text{ОД} + \text{НД}) / \text{Д}$; оборотної трансформації – $(\text{ОД} / \text{Д})$; необоротної трансформації – $(\text{НД} / \text{Д})$; оборотності – $(\text{ОД} / \text{НД})$, де ОД та НД – оборотно і необоротно деформовані еритроцити відповідно, Д – дискоцити (%) (таблиця).

Статистичну обробку даних проводили методом ANOVA з використанням програмного забезпечення «Excel» («Microsoft», США). Дані представлено у вигляді середнє \pm стандартна похибка.

Співвідношення відсотка дискоцитів, перехідних і дегенеративних клітин є важливим показником трансформації еритроцитів [3]. Щільність розподілу еритроцитів за ІС є суттєвою характеристикою

The SLDC was performed by a single prolongation of light period by 12 hours (light period was 24 hours) [6]. A week before the SLDC simulation, the rats were intraperitoneally injected with 1.0 ml of cryopreserved suspension of human CBNCs in autologous plasma [1], the content of CD34⁺ stem cells was $2-4 \times 10^5$.

Rat blood was sampled after animal decapitation simultaneously for biochemical, morphological and other studies. Animals of each age were divided into the groups ($n = 5$ in each): intact control; rats with SLDC; after CBNCs injection and SLDC simulation with the previous injection of CBNCs (CBNCs⁺ SLDC).

The erythrocyte transformation was evaluated by the method of establishing their distribution in population by the index of sphericity (IS), determined on the basis of osmotic hemolysis model from the osmotic fragility (OF) curves [2]. The OF curves were obtained using the small-angle light scattering method with device developed at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine. There was studied the dependence of light scattering intensity by erythrocyte suspension (at an angle of 90° toward the incident beam) on cell number in it. To determine the level of erythrocyte OF, 30 μl of erythromass obtained after blood sedimentation and plasma aspiration was added to a measuring vessel containing 3.0 ml of NaCl solution of different concentrations (from 0.15 to 0.05 mol/l). Then the percentage of stored cells was determined. All the studies were performed at 20°C . Values of the IS corresponded to the increase rate of erythrocyte volume in case of its transformation into spherocyte. According to the ratio of normal (discocytes), reversibly and irreversibly changed forms of erythrocytes [4], integral indices of erythrocyte transformation ones was calculated [5]: the index of transformations were calculated from $(\text{RD} + \text{ID})/\text{Dc}$; the index of reversible transformation was done using (RD/Dc) , the index of irreversible transformation was counted as (ID/Dc) , the index of reversibility was done from (RD/ID) , where RD – reversibly and ID – irreversibly deformed erythrocytes, Dc – discocytes (%) (Table).

The data were statistically processed by ANOVA using Excel software (Microsoft, USA) and presented as a mean \pm standard error.

The ratio of the percentage of discocytes, 'transitional' and degenerative cells is an important index of erythrocyte transformation [4]. The erythrocyte distribution density by the IS is an momentous characteristic of blood. The peak of erythrocyte distribution by the IS in rats, according to our data, was 1.7, in contrary to human erythrocytes, which was 1.48 [2]. There were calculated the following IS intervals:



крові. Пік розподілу еритроцитів крові за ІС у щурів згідно з отриманими нами даними дорівнює 1,7, на відміну від еритроцитів крові людини, який становить 1,48 [6]. Було розраховано наступні інтервали ІС: 1...1,05 – сфероцити, 1,06...1,5 – стоматоцити, 1,5...2 – нормальні та 2,1...3 – сплюснені дискоцити.

Аналіз отриманих даних показав (таблиця), що у крові контрольних старих тварин відсоток дискоцитів сплющеної форми (високорезистентних) був майже вдвічі вищим порівняно з молодими. Після введення ЯВК КК кількість дискоцитів у крові щурів обох вікових груп зменшувалася: у молодих – за рахунок нормальних дискоцитів, у старих – частка сплюснених дискоцитів також знижувалася (майже удвічі). Відсоток стоматоцитів за цих умов підвищувався у молодих тварин майже вдвічі, у старих – майже в 16 раз, частка сфероцитів збільшувалася тільки у молодих тварин. На тлі ІСР у старих тварин значно зменшувалася частка дискоцитів як нормальних, так і сплюснених (майже у чотири рази), у молодих – вона не змінювалася; частка стоматоцитів у старих щурів значно підвищувалася, у молодих – не змінювалася; рівень сфероцитів підвищувався у крові тварин обох вікових груп. У експериментальній групі, коли вивчали ефекти попереднього введення ЯВК КК за умов ІСР, кількість сплюснених дискоцитів у крові старих щурів відновлювалася до контрольних величин, у молодих – будь-яких змін не спостерігали. На тлі комплексного впливу ЯВК КК та ІСР відзначали зменшення відсотка нормоцитів і збільшення частки змінених форм у крові тварин обох вікових груп (таблиця).

Рівень ОК еритроцитів визначали за величиною, що дорівнює концентрації у розчині NaCl (%), за якої відбувається гемоліз 50% клітин, залежить від структурно-функціонального стану мембрани і служить одним із критеріїв оцінки її збереження: у молодих тварин ОК змінювалася (знижувалася) тільки на тлі сполучного впливу ЯВК КК та ІСР, у старих – підвищувалася за умов окремого впливу ЯВК КК та ІСР; за віком розбіжностей не виявлено (таблиця).

Відомо, що здатність еритроцитів до трансформації має адаптивне значення і визначає їх функціональну активність. Було відзначено, що індекси трансформації і оборотної трансформації (окрім молодих щурів за умов ІСР) зростали; індекс оборотності еритроцитів різко збільшувався у молодих щурів на тлі ІСР – з $(3,94 \pm 3,41)$ до $(104,5 \pm 59,1)$, у старих – на тлі ІСР та сполучного впливу ЯВК КК + ІСР (таблиця). Співвідношення кількості дискоцитів, перехідних оборотних (сфероїди, стоматоцити, ехіноцити, ямкові) і дегенеративних необорот-

1...1.05 – spherocytes, 1.06...1.5 – stomatocytes, 1.5...2 – normal and 2.1...3 – flattened discocytes.

The analysis of the obtained data showed that in the blood of control aged animals the percentage of flattened discocytes (highly resistant) was almost twice higher than in the intact control of young rats. After the injection of CBNCs, the number of discocytes in blood of rats of both age groups was decreased. In the young group it was decreased due to normal discocytes, in the aged one a part of flattened discocytes was also reduced (almost twice). The percentage of stomatocytes under these conditions was increased almost twice in young animals, in aged ones it was done almost in sixteen times, a part of spherocytes was enhanced only in young animals. During the SLDC, in the aged animals a part of discocytes both normal and flattened was significantly decreased (almost in four times), in young animals it was not changed; a part of stomatocytes in aged rats was significantly increased, in young rats it was not changed, the level of spherocytes was increased in animal blood of both age groups. In the experimental group, when the effects of previous injection of CBNCs under the SLDC were studied, the number of flattened discocytes in the blood of aged rats restored to the control values, in the young ones no changes were observed. Under a combined effect of the CBNCs and SLDC a decrease of normocyte percentage and an increase of a part of the changed forms in blood of animals of both age groups were noted (Table).

The OF level of erythrocytes was determined by a value equal to the concentration of NaCl solution (%), at which 50% cell hemolysis occurred. The degree of OF depended on structural and functional state of membrane and served as one of the criteria for assessing its preservation: in young animals the OF was changed (decreased) only under a combined effect of the CBNCs and SLDC; there were no differences in age (Table).

It is known that the transformation ability of erythrocytes is adaptive and determines their functional activity. It has been noted that the transformation and reversible indices of erythrocytes (except for young rats under the SLDC conditions) were increased; the reversibility index was increased sharply in young rats under the SLDC it was from (3.94 ± 3.41) up to (104.5 ± 59.1) , in the aged rats it was done under the SLDC and combined effect of CBNCs and SLDC (Table). The ratio of the number of discocytes, 'transitional' reversible (spheroids, stomatocytes, echinocytes) and degenerative irreversible (spherocytes, schizocytes, poikilocytes) forms is the main index of erythrocyte transformation [4], reflects the adaptive capacity of cell membrane and is an integral index of its restoration [7].



Стан еритроцитів крові молодих і старих щурів ($M \pm SE$)
Erythrocytes state in blood of young and aged rats ($M \pm SE$)

Показники Indices	Вік Age	Експериментальні групи Experimental groups			
		Контроль Control	Інверсія SLDC	ЯВК КК CBNCs	ЯВК КК + Інверсія CBNCs + SLDC
Розподіл еритроцитів за індексом сферичності, % Erythrocyte distribution by index of sphericity, %					
Сплюснені дискоцити Flattened discocytes	Молоді Young	4,19 ± 0,75	5,36 ± 1,28	4,27 ± 1,86	5,31 ± 1,34
	Старі Aged	10,4 ± 2,64 [#]	2,58 ± 0,45 ^{*,#}	4,35 ± 1,78 [*]	9,0 ± 4,61
Нормальні дискоцити Normal discocytes	Молоді Young	83,12 ± 2,12	81,16 ± 2,64	67,16 ± 3,32 [*]	74,89 ± 0,47 [*]
	Старі Aged	87,39 ± 2,03	63,69 ± 7,53 ^{*,#}	68,96 ± 0,92 [*]	71,74 ± 1,57 [*]
Дискоцити (загалом) Discocytes (totally)	Молоді Young	86,52 ± 2,32	86,52 ± 1,36	71,43 ± 5,03 [*]	80,74 ± 6,18
	Старі Aged	97,62 ± 0,72 [#]	66,27 ± 7,08 ^{*,#}	73,32 ± 2,71 [*]	78,04 ± 0,35 [*]
Стоматоцити Stomatocytes	Молоді Young	12,6 ± 2,33	12,71 ± 0,66	27,87 ± 5,28 [*]	21,95 ± 0,35 [*]
	Старі Aged	2,37 ± 0,72 [#]	32,63 ± 6,63 ^{*,#}	26,68 ± 2,71 [*]	18,21 ± 6,17 [*]
Сфероцити Spherocytes	Молоді Young	0,08 ± 0,07	0,76 ± 0,7	0,69 ± 0,4 [*]	0 [*]
	Старі Aged	0	1,09 ± 0,46 [*]	0 [#]	1,04 ± 0,02 ^{*,#}
Змінені форми (загалом) Distorted forms (totally)	Молоді Young	12,7 ± 2,32	13,47 ± 1,36	28,27 ± 5,31 [*]	21,68 ± 0,62 [*]
	Старі Aged	2,37 ± 0,72 [#]	33,61 ± 0,72 ^{*,#}	26,68 ± 2,71 [*]	19,28 ± 6,18 [*]
Осмотична крихкість Osmotic fragility					
Концентрація NaCl, % Concentration of NaCl, %	Молоді Young	0,48 ± 0,03	0,46 ± 0,01	0,5 ± 0,01	0,36 ± 0,01 [*]
	Старі Aged	0,45 ± 0,01	0,51 ± 0,01 ^{*,#}	0,48 ± 0,01 [*]	0,46 ± 0,02 [#]
Індекси Indices					
Трансформації Transformations	Молоді Young	0,15 ± 0,03	0,27 ± 0,02 [*]	0,41 ± 0,1 [*]	0,28 ± 0,01 [*]
	Старі Aged	0,2 ± 0,008 [#]	0,52 ± 0,16 ^{*,#}	0,36 ± 0,05 [*]	0,24 ± 0,09 [*]
Оборотної трансформації Reversible transformation	Молоді Young	0,15 ± 0,03	0,18 ± 0,02	0,41 ± 0,09 [*]	0,27 ± 0,02 [*]
	Старі Aged	0,2 ± 0,008 [#]	0,52 ± 0,16 ^{*,#}	0,36 ± 0,05 [*]	0,24 ± 0,09 [*]
Необоротної трансформації Irreversible transformation	Молоді Young	0,001 ± 0,0	0,009 ± 0,008	0,01 ± 0,005 [*]	0
	Старі Aged	0	0,01 ± 0,006 [*]	0	0,01 ± 0,001 ^{*,#}
Оборотності Reversibility	Молоді Young	3,94 ± 3,41	104,5 ± 59,1 [*]	7,31 ± 6,27	0 [*]
	Старі Aged	0	33,72 ± 7,55 ^{*,#}	0	17,4 ± 5,59 ^{*,#}

Примітки: різниця статистично значуща порівняно з контрольною групою щурів відповідного віку (*) та молодими щурами (#), $p < 0,05$.

Note: difference was statistically significant compared with the controls of rats of certain age (*) and young rats (#), $p < 0.05$.

них (сфероцити, шизоцити, пойкилоцити) форм – основний показник трансформації еритроцитів [3], що відображає адаптивні можливості клітинної мембрани та є інтегральним показником її відновлення [5].

Thus, erythrocyte distribution by the IS was characterized with both single and combined effects of CBNCs and SLDC to a significant decrease in the number of discocytes (especially normocytes in blood



Таким чином, розподіл еритроцитів за ІС характеризувався за умов як окремого, так і комбінованого впливу ЯВК КК та ІСР істотним зменшенням кількості дискоцитів (особливо нормоцитів у крові старих щурів) і збільшенням змінених форм у обох вікових групах, тобто гетерогенність популяції еритроцитів зростала. Але попереднє введення ЯВК КК сприяло відновленню кількості сплюснених (високо резистентних) еритроцитів у крові старих щурів до контрольного рівня. Порівняно з контролем відповідного віку зниження ОК еритроцитів відзначали у молодих тварин за умов поєданого впливу ЯВК КК і ІСР, підвищення – у старих за умов окремого впливу; за віком розбіжностей виявлено не було. Індекси трансформації, оборотної та необоротної трансформації еритроцитів підвищувалися у всіх групах, найбільше – індекс оборотності (особливо на тлі ІСР).

Автор висловлює подяку к. б. н, ст. наук. співробітникові О. В. Шилу та мол. наук. співробітникові Д. Г. Луценку.

Література

1. Бабійчук ЛО, Грищенко ВІ, Гуріна ТМ, та ін. винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб кріоконсервування ядровмісних клітин кордової крові, у тому числі стовбурових гемопоетичних клітин. Патент України № 92227. 11.10.2010.
2. Губин Д.Г. Молекулярные механизмы циркадных ритмов и принципы развития десинхроноза. Успехи физиологических наук. 2013; 44(4): 65–87.
3. Козинец ИГ. Клетки крови и костного мозга. Москва: МИА; 2004. 203 с.
4. Медведев ИН, Парахневич АВ. Микрореологические свойства эритроцитов у новорожденных поросят, перенесших при рождении острую гипоксию. Международный вестник ветеринарии. 2014; (1): 41–7.
5. Супрун ЕН, Супрун СВ, Гусева ОЕ, и др. Особенности трансформации эритроцитов у детей, страдающих бронхиальной астмой. Медицинская иммунология. 2017; 19(6): 797–802.
6. Gordiyenko OI, Gordiyenko YE, Makedonska VO. Estimation of erythrocyte population state by the spherical index distribution. Bioelectrochemistry. 2004; 62(2): 119–22.
7. Sudo A, Miki K. Circadian rhythm of catecholamine excretion in rats after phase shift of light-dark cycle. Industrial Health. 1995; 33(2): 57–66.

of aged rats) and an increase in reversible forms in both age groups, herewith a heterogeneity of erythrocyte population was raised. However, the previous injection of CBNCs contributed to restoration of the number of flattened (highly resistant) erythrocytes to the control level in the blood of old rats. Reduction of erythrocyte OF was observed in young animals under the combined effect of CBNCs and SLDC if compared with the control of certain age. The increase was revealed in aged animals under the single effect of CBNCs and SLDC; there were no differences in age. Indices of transformation, reversible and irreversible transformation of erythrocytes were increased in all the groups, the most remarkable rise was for the reversibility index, especially under the SLDC effect.

The author expresses her gratitude to Dr. O.V. Shilo, PhD, senior research fellow and D.G. Lutsenko, junior research fellow.

References

1. Babiichuk LO, Grischenko VI, Gurina TM, et al., inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, assignee. [Cryochamber for experimental cooling of laboratory animals]. Patent of Ukraine N 92227. 11.10.2010. Ukrainian.
2. Gordiyenko OI, Gordiyenko YE, Makedonska VO. Estimation of erythrocyte population state by the spherical index distribution. Bioelectro-chemistry. 2004; 62(2): 119–22.
3. Gubin DG. [Molecular mechanisms of circadian rhythms and principles of desynchronization development]. Uspekhi Fiziologicheskikh Nauk. 2013; 44(4): 65–87. Russian.
4. Kozinets GI. [Cells of blood and bone marrow]. Moscow: MIA; 2004. 203 p.
5. Medvedev IN, Parahnevich AV. [Microrheology properties of erythrocytes in newborn piglets with acute at birth hypoxia.] International Bulletin of Veterinary Medicine. 2014; (1): 41–7. Russian.
6. Sudo A, Miki K. Circadian rhythm of catecholamine excretion in rats after phase shift of light-dark cycle. Industrial Health. 1995; 33(2): 57–66.
7. Suprun EN, Suprun SV, Guseva OE, et al. [Features of transformation of red blood cells in children with bronchial asthma]. Meditsinskaya Immunologiya. 2017; 19(6): 797–802. Russian.

