

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОСМОТИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ РАЗЛИЧНЫХ ТАКСОНОВ ПОЗВОНОЧНЫХ

© 2024 г. Б. А. Герда<sup>1,\*</sup>, Е. А. Скверчинская<sup>1</sup>, А. Ю. Андреева<sup>1,2</sup>,  
А. А. Волкова<sup>1</sup>, С. П. Гамбарян<sup>1</sup>, И. В. Миндукшев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН, Севастополь, Россия

\* e-mail: bgerda@gmail.com

Поступила в редакцию 10.05.2024 г.

После доработки 20.05.2024 г.

Принята к публикации 21.05.2024 г.

Осмотическая хрупкость или резистентность эритроцитов (osmotic fragility) — параметр, отражающий способность клеток противостоять изменению осмотического градиента. Нарушения этой характеристики связаны с различными патологиями, включая гемолитические анемии, злокачественные новообразования, сердечно-сосудистые заболевания. Осмотическая резистентность может варьироваться у различных видов животных и тесно связана с экосистемой. Разработан метод определения осмотической резистентности с применением лазерного анализатора дисперсных частиц, который позволяет регистрировать изменения концентрации клеток в кинетическом режиме при постоянной температуре. Исследуемые с его помощью виды включают *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus domestica*, *Coturnix japonica domestica*, *Rana ridibunda*, *Carassius carassius* и *Lampetra fluviatilis*. Метод предложен в двух вариантах: (1) добавка воды осуществляется вручную (мануальный), (2) среда разбавляется автоматически (автоматический). В качестве характеристики осмотической резистентности использованы параметры:  $H_{50}$  (осмоляльность, при которой лизирует половина подверженных лизису клеток),  $H_{90}$  (90-процентный лизис) и  $W$  (гетерогенность популяции по степени устойчивости к лизису). Результаты, полученные с использованием разработанного метода, статистически значимо не отличаются от результатов спектрофотометрии и проточной цитометрии по параметрам  $H_{50}$  и  $W$ . Между результатами автоматического и мануального методов значимых различий так же не обнаружено. Эритроциты водных и околородных животных существенно более устойчивы к гипоосмотическому лизису. Среди всех исследованных видов наиболее устойчивы к лизису оказались эритроциты амфибий (*Rana ridibunda*) и миног (*Lampetra fluviatilis*). Наибольшая гетерогенность по степени устойчивости обнаружена у амфибий (разница в 2 раза в сравнении со всеми прочими рассмотренными таксонами). Эритроциты млекопитающих (человека и крысы) схожи по уровню резистентности, менее однородны по степени устойчивости. Половинный лизис эритроцитов птиц наблюдается при большей осмоляльности, чем у эритроцитов млекопитающих. Эритроциты птиц (*Coturnix japonica domestica*), однако, лизируют в значительно большем осмотическом диапазоне и содержат популяцию невосприимчивых к гипоосмотическому лизису клеток. Полученные данные показали, что эритроциты пресноводных низших позвоночных более осмотически устойчивы, чем эритроциты высших, что, вероятно, объясняется особенностями эмбриогенеза, экто-/эндотермностью и средой обитания.

**Ключевые слова:** осмотическая резистентность, эритроциты, лазерная дифракция, сравнительный анализ

**DOI:** 10.31857/S0044452924050029, **EDN:** XPROCR

### ВВЕДЕНИЕ

Осмотическая резистентность эритроцитов (erythrocyte osmotic fragility) характеризует способность клеток противостоять изменению осмотического градиента [1]. Осмотическая резистентность является комплексным параметром, отражающим биофизические и морфологические свойства эритроцитов, такие как степень гидратации, жесткость

цитоскелета, склонность клеток к лизису в кровообращении, форму и деформируемость эритроцитов [1–3]. Деформируемость, в свою очередь, — важнейшая характеристика, напрямую влияющая на гемореологические и гемодинамические свойства кровотока [4, 5]. Высокая деформируемость эритроцитов обусловлена, во-первых, горизонтальными взаимодействиями компонентов цитоскелета, таких как спектрин, и, во-вторых, вертикальными взаимо-

действиями между цитоскелетом и трансмембранными комплексами через анкирин, band 4.1 и 4.2, цитозольный домен белка band 3 и другие белки [6]. На деформируемость эритроцитов влияют также состояние цитоплазмы, формы гемоглобина и метаболические процессы, контролирующие уровень АТФ и окислительно-восстановительный баланс [1]. Нарушения целостности структурных белков мембраны и цитоскелета, нарушения регуляции транспорта ионов через мембрану, нарушения синтеза АТФ и некоторые другие факторы приводят к снижению деформируемости клеток [1]. Плохо деформируемые эритроциты теряют способность проходить по капиллярному руслу, где происходит основная часть газообмена, задерживаются в синусах селезенки (фитнес тест), а также элиминируются макрофагами в селезенке и печени [7, 8], что может привести к развитию анемии. Патологии, связанные с нарушением деформируемости эритроцитов, включают наследственные гемолитические анемии (наследственные сфероцитоз [9], эллиптоцитоз [10] и ксероцитоз [11], талассемия [12], серповидноклеточная анемия [13]), развитие злокачественных новообразований [14], метаболические и сердечно-сосудистые нарушения и воспалительные процессы (сепсис [15], ишемия-реперфузия [16]).

Известно, что деформируемость эритроцитов отличается между позвоночными и зависит не только от таксономической близости, но и от экосистемы [17]. Осмоляльность плазмы крови [18, 19] и осмотическая резистентность так же видоспецифичны [20]. Эритроциты водных и околводных видов амфибий более осмотически резистентны, чем эритроциты наземных [20]. Эритроциты экзотермных животных более резистентны, чем эритроциты эндотермных [20, 21]. Эритроциты птиц не подвержены полному гемолизу при погружении в чистую воду, однако стопроцентный лизис достигается путем последовательного разбавления среды [22]. Средний корпускулярный объем клеток (MCV) положительно коррелирует с осмотической резистентностью [20]. Тем не менее, проведено мало сравнительных исследований на данную тему, а механизмы, лежащие в основе межвидовых различий, все еще остаются во многом неопределенными. Получение новых сравнительных данных и совершенствование методов определения осмотической резистентности (и деформируемости, как следствие) позволят лучше понять природу межвидовых особенностей крови.

Существует ряд методов, направленных на определение деформируемости эритроцитов. Распространены методы, основанные на оценке деформируемости, как функции напряжения сдвига, которые включают модуль измерения деформиру-

емости на LORRCA (Laser Optical Rotational Red Cell Analyser) [23], RheoScan-D [24] и автоматический реоскоп ARCA (Automated Rheoscope and Cell Analyzer) [25]. В нескольких из методов оценки деформируемости также применяется проточная цитометрия: аннексиновый тест [26], ЕМА-тест [27]. Другие подходы включают атомно-силовую микроскопию [28], микропипетирование [29], оптический пинцет [30], микрогидродинамику [31], фильтрацию эритроцитов через целлюлозные колонки [32]. Ряд методов оценки деформируемости полностью или частично опирается на оценку осмотической устойчивости эритроцитов. Среди них наиболее распространены спектральный тест [33] и эктацитометрия на анализаторе LORRCA [23]. Также предложены проточная цитометрия [34] и оценка осмотического лизиса при гидродинамическом фокусировании в микропотоке [35]. Существующие методы оценки осмотической устойчивости имеют ряд недостатков, которые ограничивают их применение. Результаты теста крайне зависят от температуры [33], что обычно не контролируется при измерении степени гемолиза при помощи всех упомянутых методов. Необходимость приготовления ряда гипотонических растворов при использовании спектрального метода приводит к росту сложности отдельного эксперимента. Цитометрические методы менее трудоемки, но их протоколы позволяют рассчитать только отношение количества клеток до и после разбавления среды. Осмотическая градиентная эктацитометрия предоставляет только один параметр, соответствующий результатам спектрального метода, что усложняет сравнительный анализ данных, полученных в различных лабораториях. В данной работе предлагается новый метод определения осмотической резистентности эритроцитов. Как и при эктацитометрии, регистрация деформационных характеристик осуществляется на основе дифракционной картины образца. Эксперименты проводятся на лазерном анализаторе частиц LaSca (Laser Scattering), адаптированном к биомедицинским исследованиям. LaSca позволяет регистрировать изменение объема и формы клеток, агрегацию, агглютинацию, образование микрочастиц и лизис в кинетическом режиме при постоянстве температурных условий [36]. Ранее методом лазерной дифракции были успешно охарактеризованы объемные изменения эритроцитов при аммонийном, окислительном и осмотическом стрессе [37]. При действии на эритроциты фармакологических препаратов метод лазерной дифракции дает результаты, которые значимо соотносятся с результатами, полученными методами проточной цитометрии и микрофлюидного анализа. Показано, анализатор частиц возможно использовать для

оценки мембран эритроцитов для характеристики скрытой анемии при действии противоопухолевых препаратов [2].

Цель данного исследования — сравнительный анализ параметров осмотической резистентности эритроцитов различных таксонов позвоночных с применением разработанного нами метода, основанного на лазерной дифракции света. Среди анализируемых животных 2 вида млекопитающих (*Homo sapiens*, *Rattus norvegicus domestica*), один вид птиц (*Coturnix japonica domestica*), амфибий (*Rana ridibunda*), рыб (*Carassius carassius*) и миног (*Lampetra fluviatilis*).

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Животные.** В работе использовались: крысы линии Wistar, полученные из питомника лабораторных животных ИЭФБ РАН (Санкт-Петербург) ( $n = 7$ ). До эксперимента крысы содержались в стандартных условиях вивария. Японские перепела *Coturnix japonica domestica* ( $n = 6$ ) были получены от местного хозяйства (Санкт-Петербург, Россия) в возрасте 45–50 дней в сентябре 2023 г. Содержались в двух клетках по 5 особей. Корм/комбикорм и вода предоставлялись ad libitum. Птицы содержались при искусственном освещении с длительностью светового дня 14 ч. Температура воздуха в помещении поддерживалась постоянной 25–28°C, также был установлен рециркулятор воздуха с ультрафиолетом для дезинфекции воздуха. Взрослые особи обыкновенного карася *Carassius carassius Linnaeus* (вес 150–230 г,  $n = 12$ ) были получены в местном хозяйстве (Санкт-Петербург, Россия) в октябре 2019 г. и содержались в течение до 2 недель до эксперимента в аэрируемых аквариумах объемом 70 л, оборудованных водной проточной системой (температура воды 10–14 °C, концентрация кислорода 7–8 мг O<sub>2</sub> л<sup>-1</sup>). В период акклиматизации рыб кормили один раз в день специализированным кормом для рыб (Tetra Pond, Tetra, Melle, Германия) из расчета 5% от массы тела/особь. Особей озерной лягушки (*Rana ridibunda*) (вес  $135 \pm 10.4$  г,  $n = 15$ ) и речной миноги (*Lampetra fluviatilis*) (вес  $25 \pm 5.2$  г),  $n = 30$ ) отлавливали в осенний период 2020–2021 гг. в водоемах Ленинградской области. В период акклиматизации к лабораторным условиям (2 недели) и экспериментов лягушек содержали в затемненных пластиковых боксах с невысоким уровнем воды при температуре +4–+8°C. Миног размещали в охлаждаемых затемненных бассейнах с аэрируемой пресной водой (+4–+8°C). На период акклиматизации и экспериментов лягушек и миног не кормили.

**Участники.** Эксперименты с участием людей проведены на крови 27 здоровых доноров (возраст от 20 до 74 лет).

**Реактивы.** HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота); хлорид натрия (NaCl); хлорид калия (KCl); хлорид магния (MgCl<sub>2</sub>); D-глюкоза; этиленгликольдиаминтетрауксусная кислота (Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, EGTA). Приобретены в Sigma-Aldrich (Германия). В экспериментах с человеческой кровью использовался изотонический HEPES buffer, приготовленный в соответствии с протоколам для анализатора LORRCA, одобренного для клинических исследований [23]. Состав буфера в мМ: 10 HEPES, 140 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 5 D-глюкоза, 2 ЭГТА, pH = 7.4 (pH-метр Metler Toledo, Колумбус, Огайо, США), 300 мОсмоль/кг H<sub>2</sub>O (мОсм), контроль осмоляльности осуществлялся криоскопическим осмометром Osmomat 3000 (Gotec, Германия). Тот же буфер использовался в экспериментах с эритроцитами крыс. Для работы с эритроцитами других видов использовали следующие растворы: птицы: 10 HEPES, 140 NaCl, 2 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 14 D-глюкоза, pH=7.6, 320 мОсм; амфибии: 10 HEPES, 102 NaCl, 3 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 D-глюкоза, 2 ЭГТА, pH = 7.6, 220 мОсм; рыбы: 15 HEPES, 128 NaCl, 3 KCl, 1.5 MgCl<sub>2</sub>, 2.2 D-глюкоза, pH = 7.8, 260 мОсм; миноги: 10 HEPES, 140 NaCl, 4 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5.5 D-глюкоза, 2 ЭГТА, pH = 7.4, 260 мОсм.

**Выделение эритроцитов из цельной крови.** Человеческую венозную кровь брали при помощи закрытой системы взятия венозной крови S-Monovette®, с натрия цитратом 3.2% (Sarstedt, Германия). Кровь крыс собирали в гепаринизированные пробирки (гепарин в физрастворе до конечной концентрации гепарина 50 МЕ/мл), для анестезии был использован ингаляционный наркоз 3% изофлурана [38]. Кровь перепелов собирали в гепаринизированные пробирки при пункции плечевой вены, 0.6–0.8 мл, без применения анестезии, поскольку болевое воздействие от тонкой иглы незначительно и продолжается не долго [39]. Кровь амфибий (1.5–2 мл) отбирали путем пункции сердца стерильным гепаринизированным пластиковым шприцем на 2 мл после анестезирования животного. Кровь рыб (1–1.5 мл) собирали в гепаринизированные шприцы путем пункции хвостовой вены. У миног кровь (1.5–2 мл) отбирали путем декапитации анестезированного животного и последующего сбора крови в стерильную гепаринизированную пластиковую пробирку объемом 5 мл. Использованная анестезия для амфибий, рыб и миног — SYNCAINE (MS 222; fish anesthetic; Syndel, США), расчет дозы проводили по калькулятору

Syndel. Во всех случаях эритроциты дважды промывали буфером физиологической осмоляльности, соответствующей виду животного.

*Метод лазерной дифракции (мануальный).* Эксперименты проводили на лазерном анализаторе частиц LaSca-ТМ (БиоМедСистем, Санкт-Петербург, Россия). Эритроциты вносили в кювету, содержащую 1000 мкл буфера исходной осмоляльности для исследуемого вида (конечная концентрация клеток  $1-2 \cdot 10^8$  клеток/мл), регистрировали светорассеяние. Снижали осмоляльность добавками 250–500 мкл дистиллированной воды ( $dH_2O$ ), и на каждом шаге изменения осмоляльности вносили кратное уровню разбавления количество суспензии эритроцитов для поддержания постоянства концентрации клеток. Гемолиз характеризовали по данным кинетики прямого светорассеяния. Снижение осмоляльности среды относительно осмоляльности цитоплазмы приводит к росту объема эритроцитов и их последующему лизису [40]. Интенсивность светорассеяния зависит как от объема частиц, так и от их концентрации [41]. Так как вклад данных факторов зависит от угла регистрации рассеяния света, рассчитали оптимальный угол регистрации сигнала при помощи программного обеспечения MiePlot v4.6.14, предназначенного для теоретических расчетов кривых светорассеяния. Численные расчеты рассеяния показали, что оптимальный угол составляет 5.5 градусов.

*Спектрофотометрический метод.* В 8 пробирок вносили по 2 мл HEPES-buffer с осмоляльностями (мОсм): 300, 200, 150, 133, 120, 109, 100, 92. Разведения соответствуют использованным на лазерном анализаторе частиц при экспериментах с эритроцитами человека. В пробирки с разведениями вносили эритроциты (конечная концентрация  $1.25 \cdot 10^7$  клеток/мл). Клетки осаждали центрифугированием (20 сек, 3000 g) (Eppendorf 5415D, Eppendorf, Германия). Анализ супернатанта проводили на спектрофотометре СПЕКС ССП-715-М (ООО «Спектроскопические системы») при 25 °C и длине волны 540 нм.

*Проточная цитометрия.* Использовали модифицированный протокол, предложенный Won и Suh [34]. Осмоляльности разведений те же, что использовались при спектрофотометрии (конечная концентрация эритроцитов  $4 \cdot 10^8$  клеток/мл). Эксперименты проводили на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, Brea, США) при 25 °C. Запись осуществляли в режиме прямого (FSC-A) / бокового (SSC-A) рассеяния и кинетическом режиме прямого рассеяния (FSC-A) / время (Time). Длительность записи одной пробы — 20 секунд, по истечении которых меняли пробу на следующую с меньшей осмоляльностью и продолжали запись.

*Методика оценки результатов экспериментов.* Зависимости вида доза-ответ (dose-response), основанные на уравнении Хилла, широко применяются в биологических науках [42]. В приложении к описанию гипоосмотического лизиса уравнение дозозависимости принимает следующий вид (Уравнение 1):

$$Lys = Lys_{max} - \frac{Lys_{max}}{1 + \frac{H_{50}^h}{Osm^h}}, \quad (1)$$

где  $Lys$  — процент лизированных клеток, %;  $Lys_{max}$  — максимально возможный лизис, %;  $H_{50}$  — половинный ответ (осмоляльность, при которой лизирует половина клеток в диапазоне между  $Lys_{max}$  и  $Lys_{min}$ ), мОсм;  $h$  — коэффициент Хилла;  $Osm$  — текущая осмоляльность суспензии клеток, мОсм.

Коэффициент Хилла и  $H_{50}$  рассчитываются по линеаризованной форме уравнения Хилла (Уравнение 2):

$$\ln \left( \left| \frac{Lys_{max}}{Lys - Lys_{max}} + 1 \right| \right) = h (\ln H_{50} - \ln Osm) \quad (2)$$

Строится зависимость  $\ln \left( \left| \frac{Lys_{max}}{Lys - Lys_{max}} + 1 \right| \right)$  от

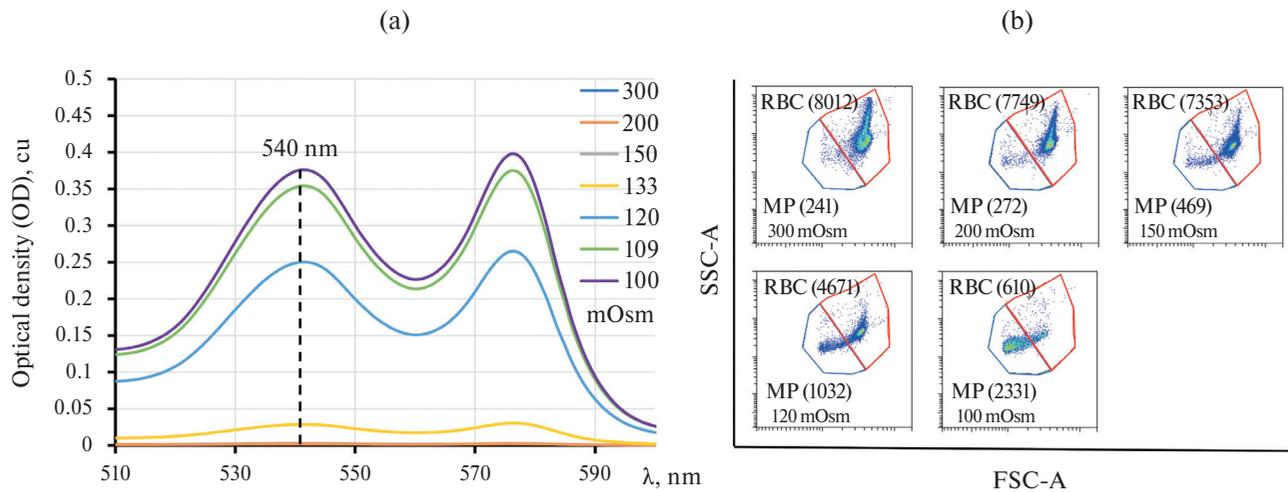
$\ln Osm$ . Наклон построенной прямой — есть коэффициент Хилла, а точка пересечения с осью  $\ln Osm$  — натуральный логарифм  $H_{50}$ .

Для построение данной зависимости на первом этапе так же необходимо рассчитать экспериментальный процент лизиса при исследуемых осмоляльностях (Уравнение 3):

$$\widehat{Lys} = \left( 1 - \frac{R}{R_{max}} \right) * 100, \quad (3)$$

где  $\widehat{Lys}$  — экспериментальный процент лизиса при текущей осмоляльности, %;  $R_{max}$  — последняя экспериментальная точка перед началом лизиса клеток, у.е;  $R$  — ответ при текущей осмоляльности, у.е. Описываемый алгоритм применим и для обработки данных спектрофотометрии и проточной цитометрии. При спектрофотометрии расчет ведется по оптической плотности высвобожденного гемоглобина в 540 нм (рис. 1a). При проточной цитометрии — по числу зарегистрированных событий в области (гейте) с клетками (рис. 1b). По точкам строится график линеаризованного уравнения Хилла (Уравнение 2) и определяются параметры  $h$  и  $H_{50}$ .

В большинстве случаев значение  $Lys_{max}$  можно приравнять к 100%, однако эритроциты некоторых животных могут содержать субпопуляции клеток,



**Рис. 1.** Примеры первичных данных, полученных методами спектрофотометрии и проточной цитометрии. (a) — спектрофотометрия. Разными цветами показаны графики зависимости оптической плотности (OD) от длины волны ( $\lambda$ ), отмечена использованная длина волны (540 нм). OD возрастает по мере снижения осмоляльности. Точка перед началом лизиса ( $R_{max}$ ) — 150 мОсм. (b) — проточная цитометрия. Снижение осмоляльности ведет к снижению числа регистрируемых событий в области с клетками (RBC) и росту количества микрочастиц (MP). Точка перед началом лизиса ( $R_{max}$ ) — 200 мОсм. Приведенные данные получены на эритроцитах человека. Выделение красным — область с эритроцитами, выделение синим — область с микрочастицами.

не подверженных гипоосмотическому лизису [22]. Некоторые воздействия на эритроциты, такие как сильный окислительный стресс [37] или действие лекарственных препаратов [2], так же приводят к росту жесткости клеток и их частичной невосприимчивости к лизису [37]. Для оптимизации значения  $Lys_{max}$  использовали метод SLSQP (Sequential Least Squares Programming) из библиотеки SciPy 1.13.0 [43], который позволяет решать последовательность подзадач оптимизации, каждая из которых оптимизирует квадратичную модель цели с учетом линеаризации ограничений. Выбранная функция потерь — сумма квадратов остатков, разделенная на количество исследованных осмоляльностей (Уравнение 4):

$$loss = \frac{\sum_{Osm_0}^{Osm_n} (\widehat{Lys} - Lys)^2}{n}, \quad (4)$$

где  $Osm_0$  — исходная осмоляльность, мОсм;  $Osm_n$  — последняя (наименьшая) исследуемая осмоляльность, мОсм;  $\widehat{Lys}$  — экспериментальный процент лизиса, %;  $Lys$  — рассчитанный при той же осмоляльности процент лизиса, %;  $n$  — количество исследованных осмоляльностей (число шагов разбавления).

Осмоляльности, соответствующие определенному проценту лизиса (включая  $H_{10}$  и  $H_{90}$ ), рассчитываются по выведенной из уравнения 1 формуле (Уравнение 5):

$$H_x = H_{50} \left( \frac{100 - x}{x} \right)^{\frac{1}{h}}, \quad (5)$$

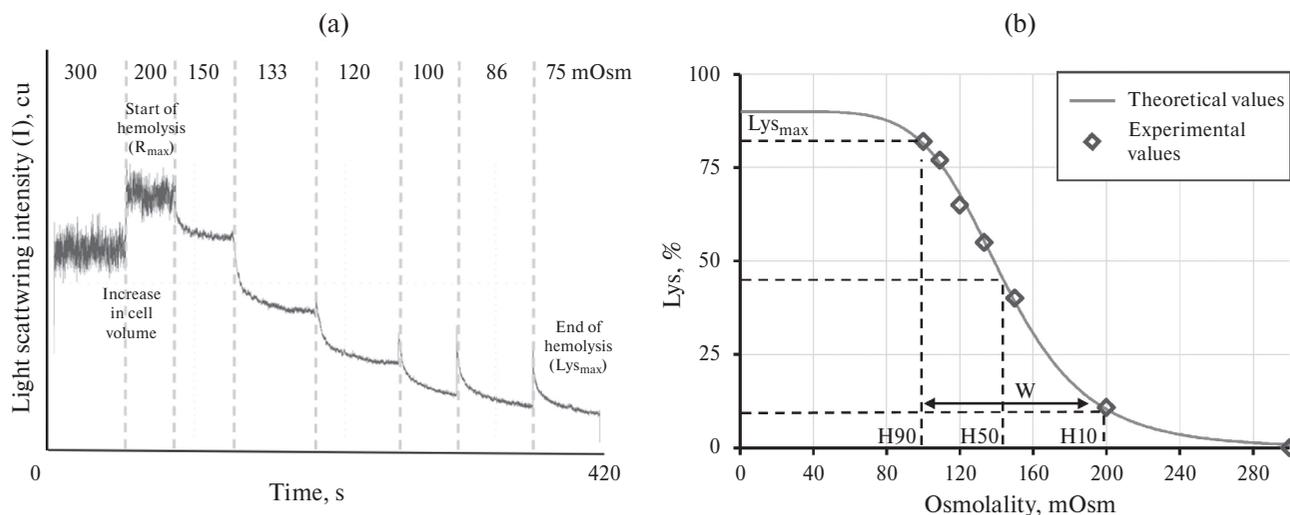
где  $x$  — процент лизировавших клеток, %.

Параметр  $W$  характеризует гетерогенность популяции клеток по их восприимчивости к лизису в осмотическом градиенте и определяется, как разность между  $H_{90}$  и  $H_{10}$  (Уравнение 6):

$$W = H_{10} - H_{90} \quad (6)$$

При использовании мануального метода лазерной дифракции расчеты параметров велись по интенсивности светорассеяния, регистрируемой на 5.5 градусах (Рис. 2а). Ключевые параметры —  $H_{50}$ ,  $H_{10}$ ,  $H_{90}$ ,  $W$  и, при неполном лизисе,  $Lys_{max}$  (рис. 2б).

Осмотическая резистентность, таким образом, характеризуется 5 параметрами, которые наиболее полно описывают гипоосмотический лизис клеток:  $H_{50}$ ,  $H_{10}$ ,  $H_{90}$ ,  $W$  и  $Lys_{max}$  [44]. Параметр  $H_{50}$  широко используется для описания осмотической устойчивости эритроцитов, соответствует (при равенстве  $Lys_{max}$  100%) точке лизиса половины клеток, характеризует среднюю осмотическую устойчивость эритроцитов [1]. Параметры  $H_{10}$  и  $H_{90}$  характеризуют начало и окончание лизиса. Параметр  $W$  описывает осмотический диапазон, в котором протекает лизис клеток (неоднородность популяции по степени устойчивости). Параметр  $Lys_{max}$  характеризует максимальный процент лизиса.



**Рис. 2.** Пример первичных данных, полученных мануальным методом лазерной дифракции, и визуализация ключевых параметров на лизисной кривой. (a) — метод лазерной дифракции (мануальный). Интенсивность светорассеяния возрастает ввиду роста объема клеток при осмоляностях 200 и 150 мОсм. Затем падает по мере дальнейшего снижения осмоляльности в результате гемолиза. Точка перед началом лизиса ( $R_{max}$ ) — 150 мОсм. (b) — лизисная кривая, построенная по описанному алгоритму. Данные получены на эритроцитах птиц для демонстрации неполного лизиса клеток и параметра  $Lys_{max}$ . Отображены ключевые параметры, характеризующие устойчивость эритроцитов ( $H_{50}$ ,  $H_{90}$ ,  $H_{10}$ ,  $W$  и  $Lys_{max}$ ).

*Метод лазерной дифракции (автоматический).*

Эксперименты проведены на лазерном анализаторе частиц LaSca-ТМ (БиоМедСистем, Санкт-Петербург, Россия). Снижение осмоляльности суспензии проводили автоматически с заданной скоростью разбавления dH<sub>2</sub>O (8.33 мкл/с). Запись интенсивности светорассеяния (реакции клеток) осуществлялась с шагом 0.096 с. Осмоляльность суспензии в каждой точке рассчитали по формуле (уравнение 7):

$$Osm = \frac{Osm_0 * V_0}{V_0 + v_v t}, \tag{7}$$

где  $Osm$  — осмоляльность в отдельной точке, мОсм;  $Osm_0$  — исходная осмоляльность среды, мОсм;  $V_0$  — исходный объем среды, мкл;  $v_v$  — скорость подачи воды, мкл/с;  $t$  — время, прошедшее с начала эксперимента, с. Соответствие фактических осмоляльностей теоретическим периодически контролировали на осмометре.

Так как поддержание постоянства концентрации клеток требовало бы подключения второго насоса, подающего суспензию эритроцитов, был разработан математический алгоритм коррекции исходной экспериментальной зависимости, компенсирующий отсутствие добавок суспензии. Получили теоретическую зависимость, характеризующую падение светорассеяния при снижении концентрации дисперсных частиц (латексы известного размера) (Уравнение 8):

$$I_d = \frac{I_0 * V_0}{V_0 + k_d t}, \tag{8}$$

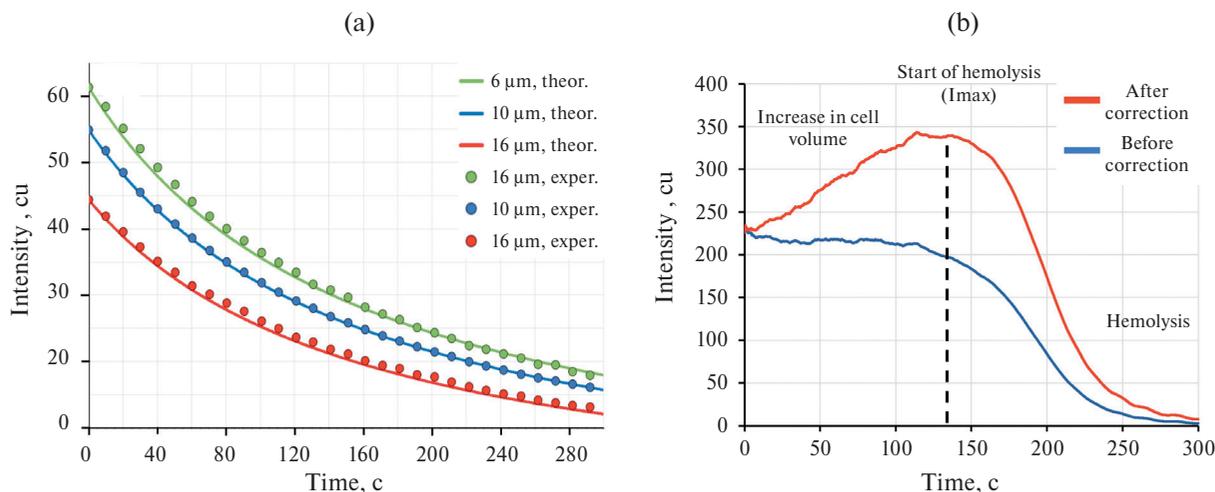
где  $I_d$  — интенсивность в отдельной точке, у.е.;  $I_0$  — исходная интенсивность до начала разбавления, у.е.;  $k_d$  — экспериментально определяемый временной коэффициент, необходимый ввиду наблюдаемых отличий теоретических результатов при использовании  $v_v$  от наблюдаемых экспериментально.

Для нахождения  $k_d$  провели серию экспериментов по разбавлению частиц латекса диаметрами 6, 10 и 16 мкм в течение 5 минут. Коэффициент  $k_d$  подобран таким образом, чтобы теоретическая зависимость соответствовала экспериментальной. Наибольшее соответствие между теоретическими и экспериментальными зависимостями наблюдали при значении  $k_d = 6.3$  и значении  $v_v = 8.33$  (рис. 3а). Провели корректировку интенсивностей светорассеяния (Уравнение 9):

$$I = I_e * \frac{I_{e0}}{I_d}, \tag{9}$$

где  $I$  — искомая теоретическая интенсивность, рассчитываемая для каждой точки;  $I_e$  — экспериментально полученная интенсивность для той же точки;  $I_{e0}$  — начальная экспериментальная интенсивность.

Вычисление параметров осмотической резистентности проводили по скорректированной зави-



**Рис. 3.** Коррекция интенсивности светорассеяния. (a) — теоретические и экспериментальные зависимости интенсивности от концентрации дисперсных частиц для латексов диаметрами 6, 10 и 16 мкм. Теоретические и экспериментальные зависимости совпадают при  $k_d = 6.3$ ,  $v_p = 8.33$ . (b) — интенсивности светорассеяния до и после коррекции. Данные получены на эритроцитах человека. На скорректированной зависимости представлен рост интенсивности ввиду увеличения объема эритроцитов.

симости (рис. 3b) по алгоритму, использованному для мануального метода лазерной дифракции.

Время автоматизированного анализа составляет 5–7 минут. Для общего анализа эритроцитов достаточно 5 мкл цельной крови. В предыдущих работах продемонстрировано, что использование многоэлементной системы детектирования рассеянного света так же позволяет дифференцировать процессы изменения объема и лизиса клеток, оценить функцию распределения частиц по размерам (эритроцитарную гистограмму) [36]. Таким образом, в результате исследования указанного объема крови можно получить 4–6 количественно нормируемых параметров, характеризующих объем, форму и осмотическую устойчивость эритроцитов.

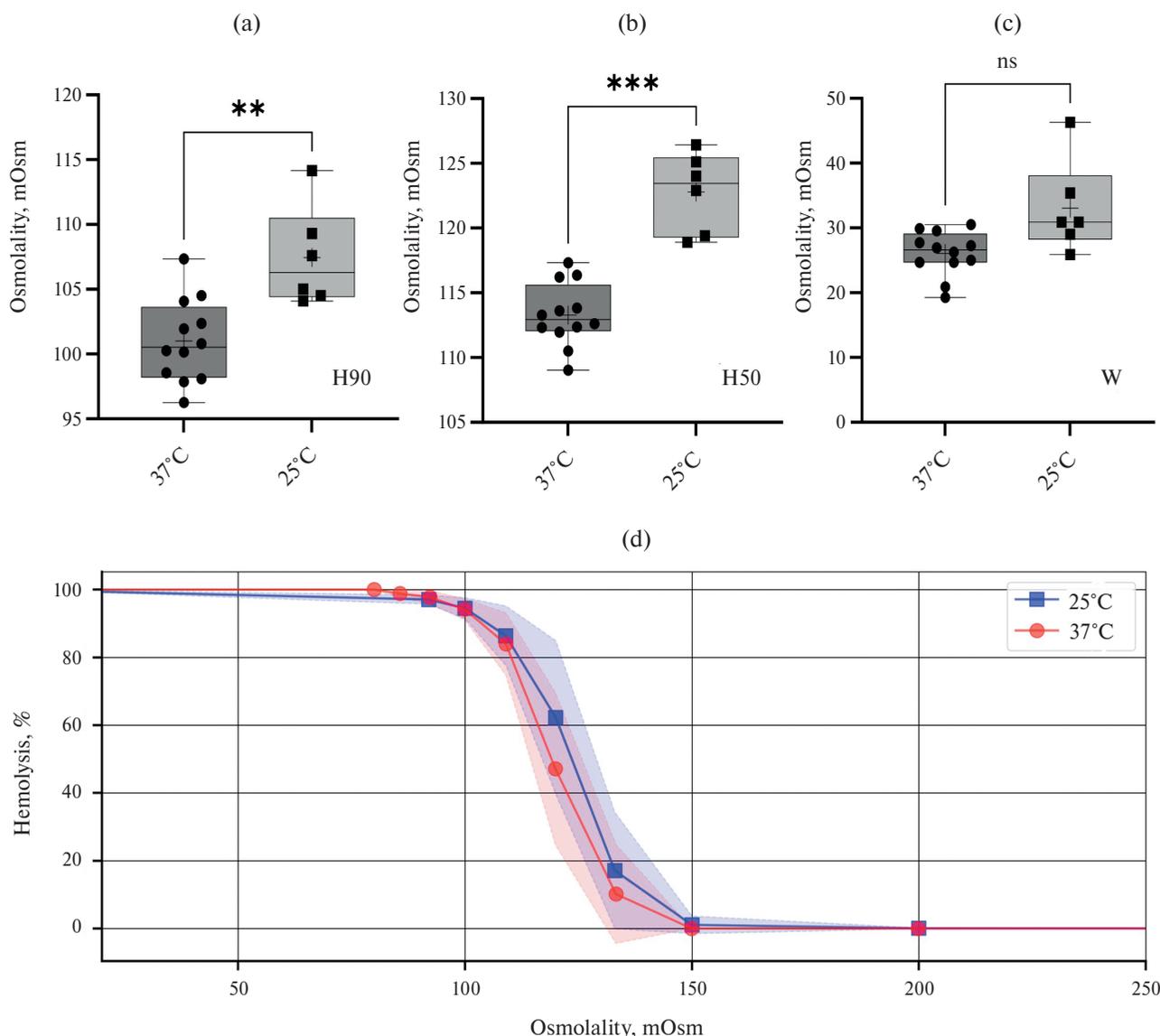
**Анализ данных.** Проверку на нормальность распределения осуществляли при помощи Shapiro–Wilk test и Kolmogorov–Smirnov test. При множественных сравнениях статистическую обработку проводили с использованием One-way ANOVA и Tukey’s multiple comparisons test (сравнение метода лазерной дифракции с спектрофотометрией и проточной цитометрией, сравнение осмотической резистентности различных видов животных). При сравнении двух непарных переменных использовали Welch’s t test (оценка влияния температуры). При сравнении двух парных переменных — paired t-test (сравнение мануального и автоматического методов лазерной дифракции). Корреляцию оценивали по Pearson correlation coefficient. Формат представления данных — mean ± sd. Статистически значимые различия —  $p < 0.05$ . Статистическая обработка проведена в Graphpad Prism 10.1.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, США). Работа с данными проточной цитометрии осуществлялась в CytExpert (Beckman-Coulter, Brea, CA, США). Данными, по-

лученными по методу лазерной дифракции, — LaSca\_32v.1498 (BioMedSystems Ltd., Санкт-Петербург, Россия). Параметры осмотической резистентности рассчитывались при помощи Python 3.12.0 и следующих библиотек: Pandas 2.2.2, SciPy 1.13.0, Matplotlib 3.8.4 и Numpy 1.26.4. Python скрипт для обработки первичных данных тестов на осмотическую резистентность представлен на GitHub странице нашего проекта: <https://github.com/ldelt/OFTCalculator>.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Влияние температуры на осмотическую резистентность эритроцитов.** Известно, что осмотическая резистентность зависит от температуры [33], которая не учитывается при использовании других методов. Для оценки влияния температуры, провели серию экспериментов по определению осмотической резистентности по методу лазерной дифракции при 25°C (комнатная температура, используемая при применении других методов) и 37°C (физиологическая температура для эритроцитов человека). При 25°C существенно возрастают  $H_{50}$  и  $H_{90}$  (рис. 4a, b), однако гетерогенность популяции клеток по степени устойчивости к гипоосмотическому лизису ( $W$ ) значимо не изменяется (рис. 4c). Лизисная кривая при 25°C смещена в область более высоких осмоляльностей (рис. 4d).

Так как снижение температуры относительно физиологической привело к статистически значимому снижению осмотической резистентности эритроцитов человека, эксперименты по определению осмотической устойчивости эритроцитов человека и животных далее проводили при соответ-



**Рис. 4.** Осмотическая резистентность эритроцитов человека при 25 и 37 °C. (a) — сравнение по  $H_{90}$ , (b) — сравнение по  $H_{50}$ , (c) — сравнение по  $W$ . Усы — минимум и максимум,  $n = 12$  для 37 °C,  $n = 6$  для 25 °C, + — среднее значение, ns —  $p > 0.05$ , \*\* —  $p < 0.01$ , \*\*\* —  $p < 0.001$ , Welch's t test. (d) — зависимости процента лизиса (Lys) в экспериментальных точках от осмоляльности среды (Osm). Полупрозрачное облако — стандартное отклонение (sd).

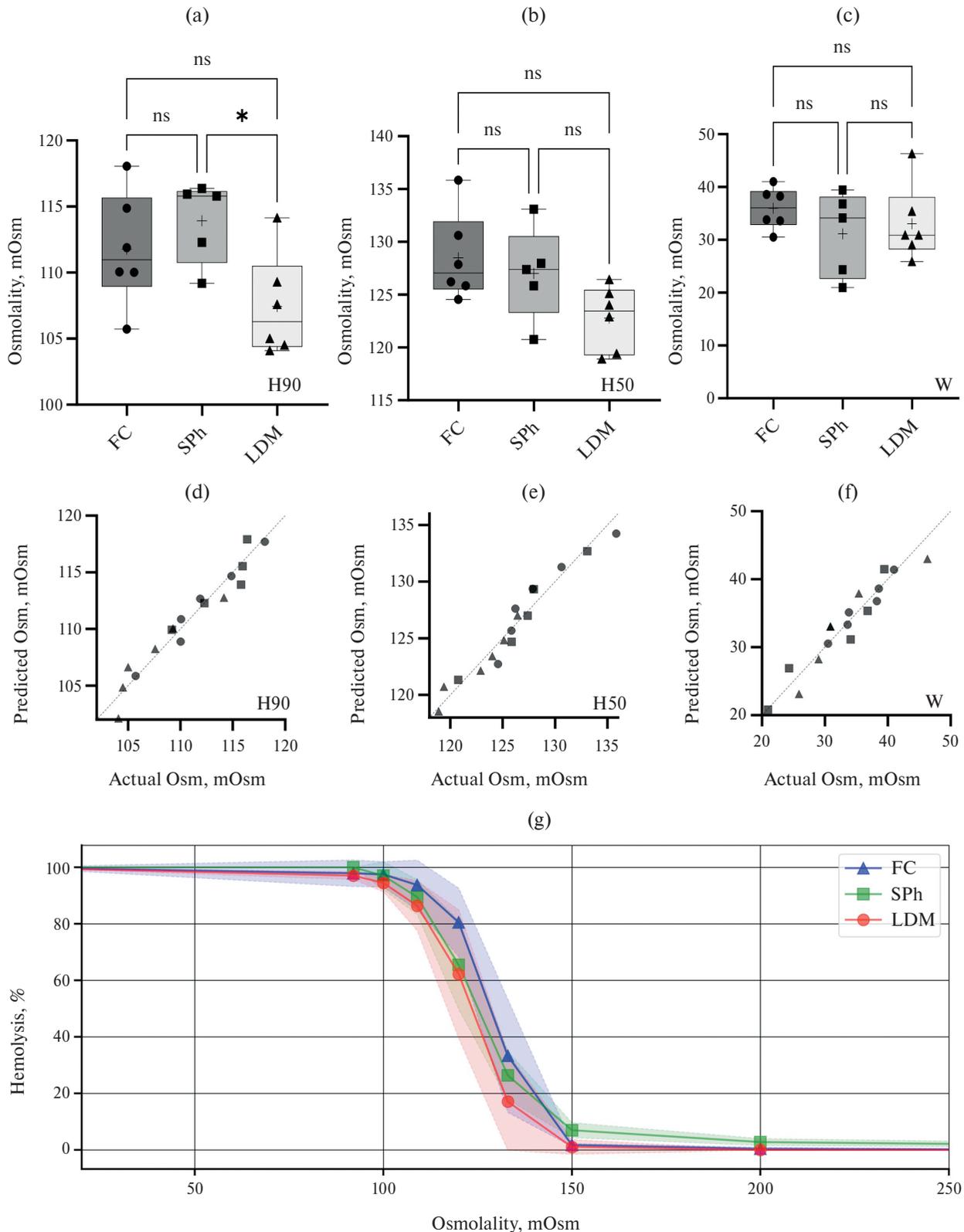
ствующих физиологических температурах только методом лазерной дифракции.

*Сравнение метода лазерной дифракции с методами спектрофотометрии и проточной цитометрии.* Для валидации метода лазерной дифракции и представленного алгоритма оценки осмотической устойчивости, разработанный метод сравнили с спектрофотометрией и проточной цитометрией на примере человеческих эритроцитов. Температура — 25 °C. Однофакторный дисперсионный анализ не выявил влияние использованного метода на параметры  $H_{50}$  ( $F_{(2,14)} = 3.439$ ,  $p > 0.05$ ) и  $W$  ( $F_{(2,14)} = 0.7706$ ,  $p > 0.05$ ), но выявил на параметр  $H_{90}$  ( $F_{(2,14)} = 4.173$ ,  $p = 0.038$ ). Статистически значимые различия обна-

ружены только между методами лазерной дифракции и спектрофотометрии и только параметру  $H_{90}$  (рис. 5a, b, c).

Исходя из близости лизисных кривых, построенных по экспериментальным точкам (особенно для методов лазерной дифракции и спектрофотометрии) (рис. 5g), а также из близости рассчитываемых параметров осмотической резистентности (рис. 5d, e, f), допустимо использование любого из трех описанных методов и сравнение получаемых с их помощью параметров между собой.

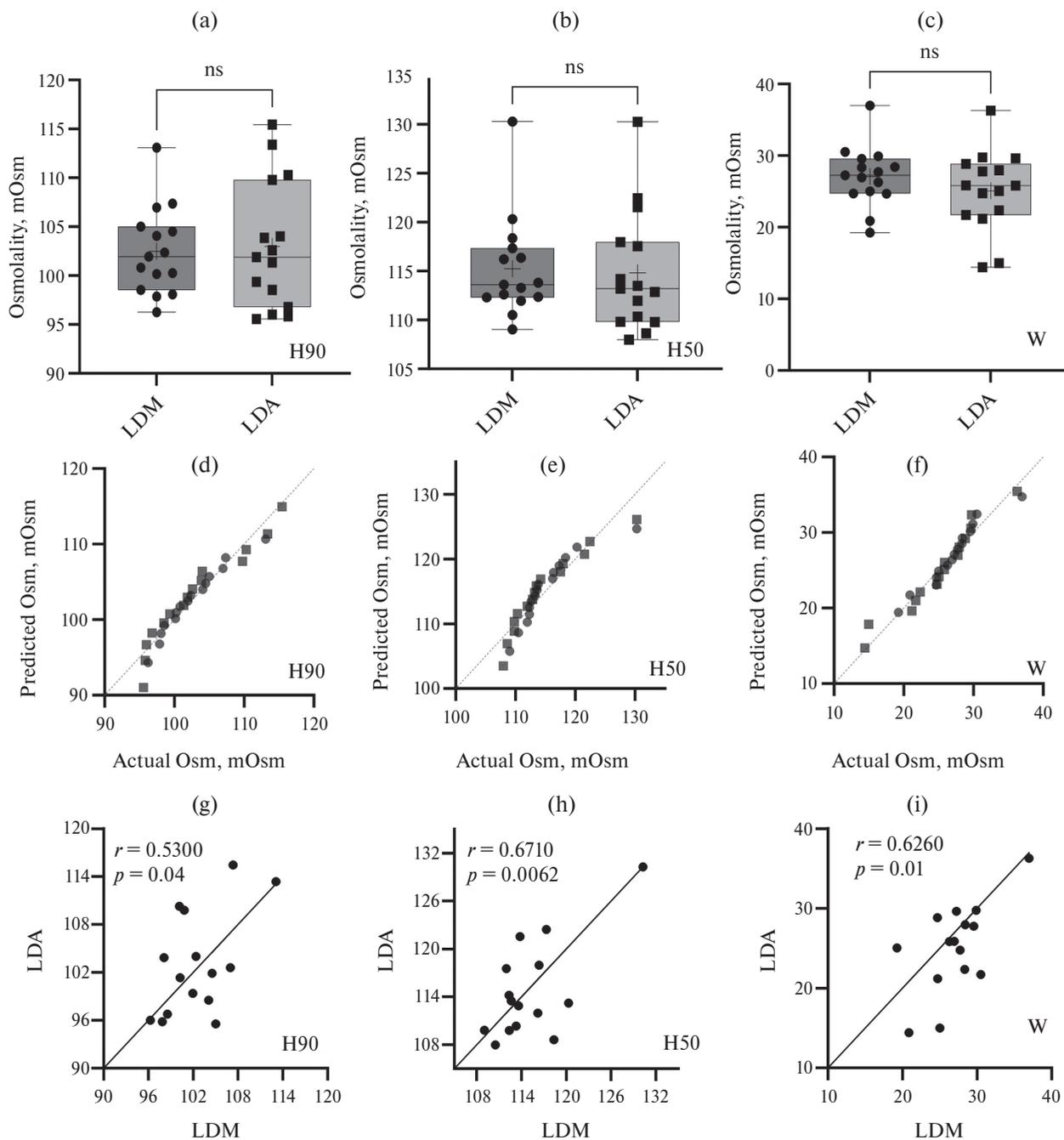
*Сравнение мануального и автоматического методов лазерной дифракции.* Для упрощения протокола эксперимента и снижения вероятности допущения



**Рис. 5.** Сравнение мануального метода лазерной дифракции с проточной цитометрией и спектрофотометрией при оценке осмотической резистентности эритроцитов человека. (a) — сравнение по  $H_{90}$ . (b) — сравнение по  $H_{50}$ . (c) — сравнение по  $W$ . FC — проточная цитометрия ( $n = 6$ ), SPh — спектрофотометрия ( $n = 5$ ), LDM — мануальный метод лазерной дифракции ( $n = 6$ ), усы — минимум и максимум, + — среднее значение, ns —  $p > 0.05$ , \* —  $p < 0.05$ , Tukey's multiple comparisons test. (d) — QQ-plot для  $H_{90}$ . (e) — QQ-plot для  $H_{50}$ . (f) — QQ-plot для  $W$ . Predicted — квантили стандартного нормального распределения. (g) — зависимости процента лизиса ( $Lys$ ) в экспериментальных точках от осмоляльности среды ( $Osm$ ); полупрозрачное облако — стандартное отклонение ( $sd$ ).

ошибок, разработали автоматический метод лазерной дифракции, который затем сравнили с ранее апробированным мануальным методом. Автоматический метод апробировали на эритроцитах человека. При оценке осмотической резистентности эритроцитов человека различий по параметрам  $H_{90}$ ,

$H_{50}$  и  $W$  выявлено не было (рис. 6а, б, с). Распределения случайных величин подчиняются нормальному закону (Shapiro-Wilk test, Kolmogorov-Smirnov test,  $p > 0.05$ ) при близости распределения индивидуальных значений (рис. 6д, е, ф). Параметры  $H_{90}$ ,  $H_{50}$  и  $W$ , полученные с помощью автоматического



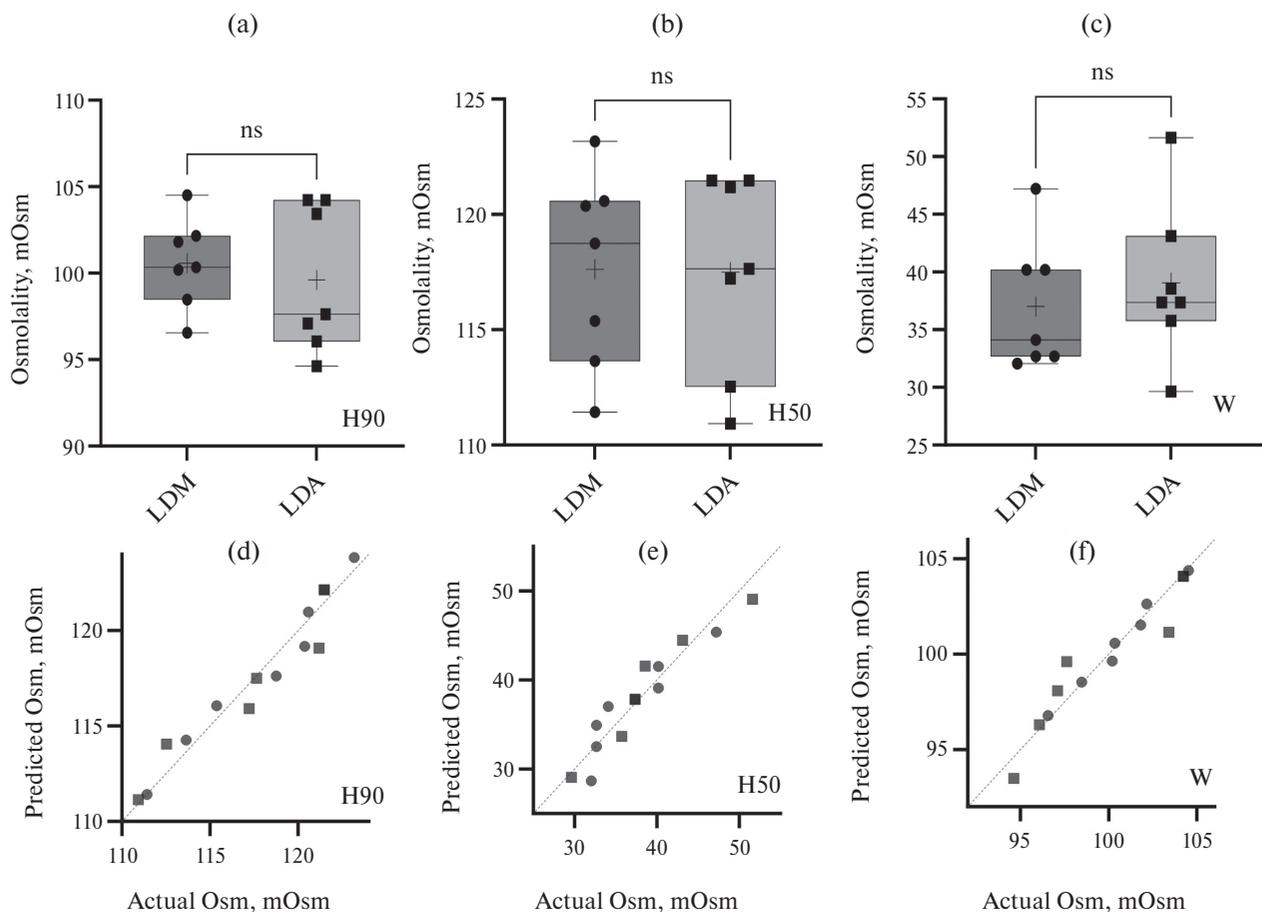
**Рис. 6.** Сравнение результатов автоматического и мануального методов лазерной дифракции при анализе осмотической резистентности эритроцитов человека. (а) — сравнение результатов по  $H_{90}$ . (б) — сравнение по  $H_{50}$ . (с) — сравнение по  $W$ . Усы — минимум и максимум, + — среднее значение,  $n = 15$ , ns —  $p > 0.05$ , Paired t test. (д) — QQ-plot для  $H_{90}$ . (е) — QQ-plot для  $H_{50}$ . (ф) — QQ-plot для  $W$ . Predicted — квантили стандартного нормального распределения. (г) — корреляции между мануальным и автоматическим методами по параметрам  $H_{90}$ . (h) — корреляция по  $H_{50}$ . (i) — корреляция по  $W$ . левый верхний угол — Pearson  $r$  и  $p$ -value. LDM — мануальный метод лазерной дифракции, LDA — автоматический метод лазерной дифракции.

метода, коррелируют с соответствующими параметрами для мануального метода (рис. 6g, h, i).

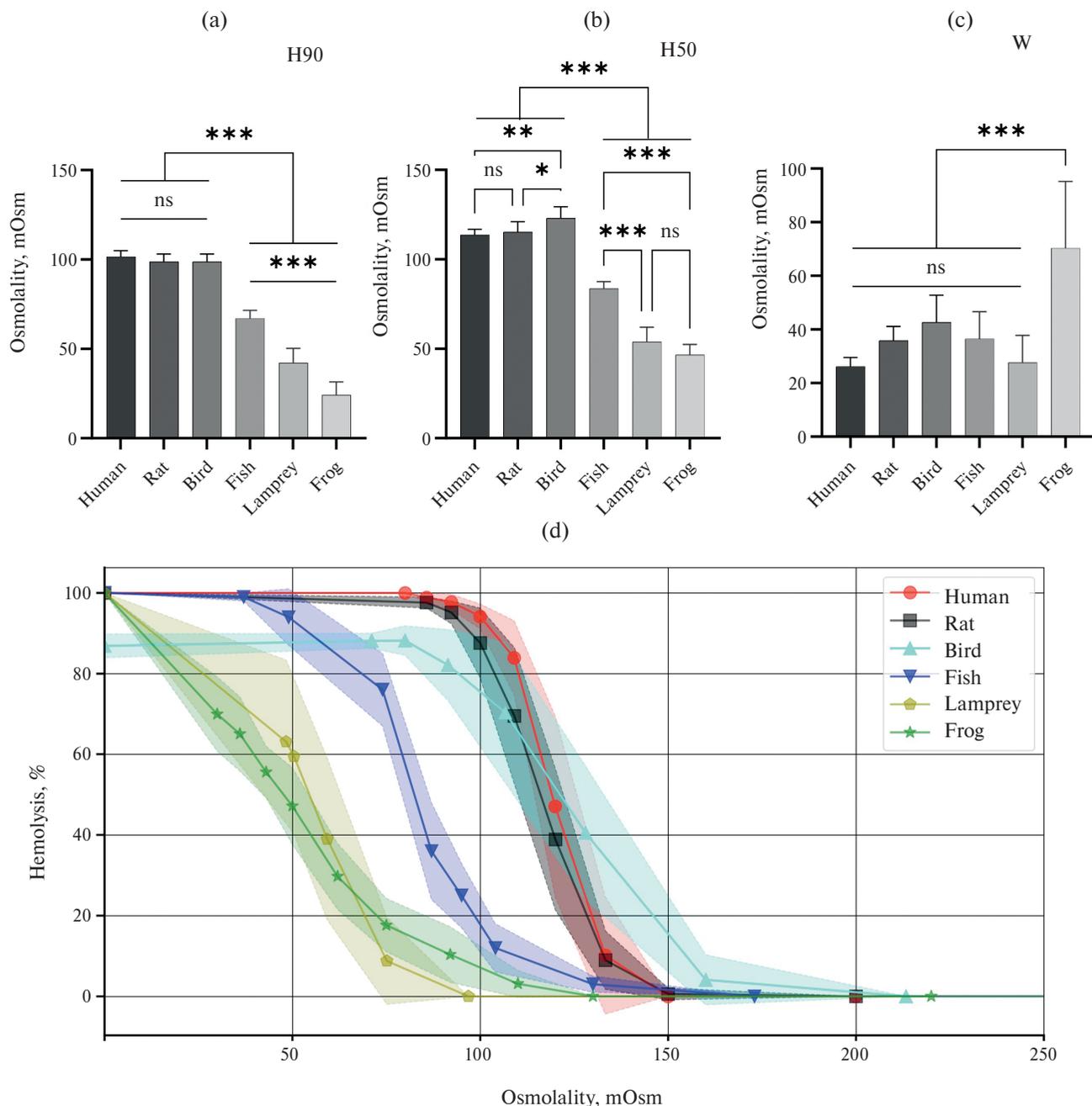
Для эритроцитов крыс статистически достоверных различий между методами по параметрам  $H_{90}$ ,  $H_{50}$  и  $W$  не выявлено (рис. 7a, b, c). Распределения подчиняются нормальному закону (Shapiro-Wilk test, Kolmogorov-Smirnov test,  $p > 0.05$ ), распределения для обоих методов близки друг к другу на прямой нормального распределения (рис. 6d, e, f).

Оценка осмотической резистентности эритроцитов человека и крысы при помощи мануального и автоматического методов лазерной дифракции привела к статистически близким результатам по всем оцениваемым параметрам. Основные преимущества автоматического варианта метода: сокращение времени проведения эксперимента, снижение вероятности человеческой ошибки, отсутствие влияния на результат ошибок пипетирования и суспендирования, снижение трудозатратности эксперимента.

*Сравнение осмотической резистентности эритроцитов различных таксонов позвоночных.* Провели сравнительный анализ осмотической устойчивости эритроцитов различных таксонов позвоночных для выявления видовых и групповых особенностей. Использовали мануальный метод лазерной дифракции, так как он позволяет провести оценку устойчивости при физиологических температурах и также ранее уже был успешно применен для оценки осмотической резистентности эритроцитов человека и животных [37, 44]. Однофакторный дисперсионный анализ выявил значимые различия между группами по параметрам  $H_{90}$  ( $F_{(5,54)} = 369.5$ ,  $p < 0.001$ ),  $H_{50}$  ( $F_{(5,54)} = 350.0$ ,  $p < 0.001$ ) и  $W$  ( $F_{(5,54)} = 19.50$ ,  $p < 0.001$ ). Осмотическая устойчивость эритроцитов человека и крысы не отличается по параметрам  $H_{90}$  и  $H_{50}$ , однако эритроциты крыс превосходят эритроциты человека по параметру  $W$  (рис. 8a, b, c). У птиц параметры  $H_{50}$  и  $W$  превосходят таковые для млекопитающих, однако, несмотря на существенный рост  $W$ , ста-



**Рис. 7.** Сравнение результатов автоматического и мануального методов лазерной дифракции при анализе осмотической резистентности эритроцитов крыс. (a) — сравнение результатов по  $H_{90}$ . (b) — сравнение по  $H_{50}$ . (c) — сравнение по  $W$ . Усы — минимум и максимум, + — среднее значение,  $n = 7$ , ns —  $p > 0.05$ , Paired t test. (d) — QQ-plot для  $H_{90}$ . (e) — QQ-plot для  $H_{50}$ . (f) — QQ-plot для  $W$ . Predicted — квантили стандартного нормального распределения.



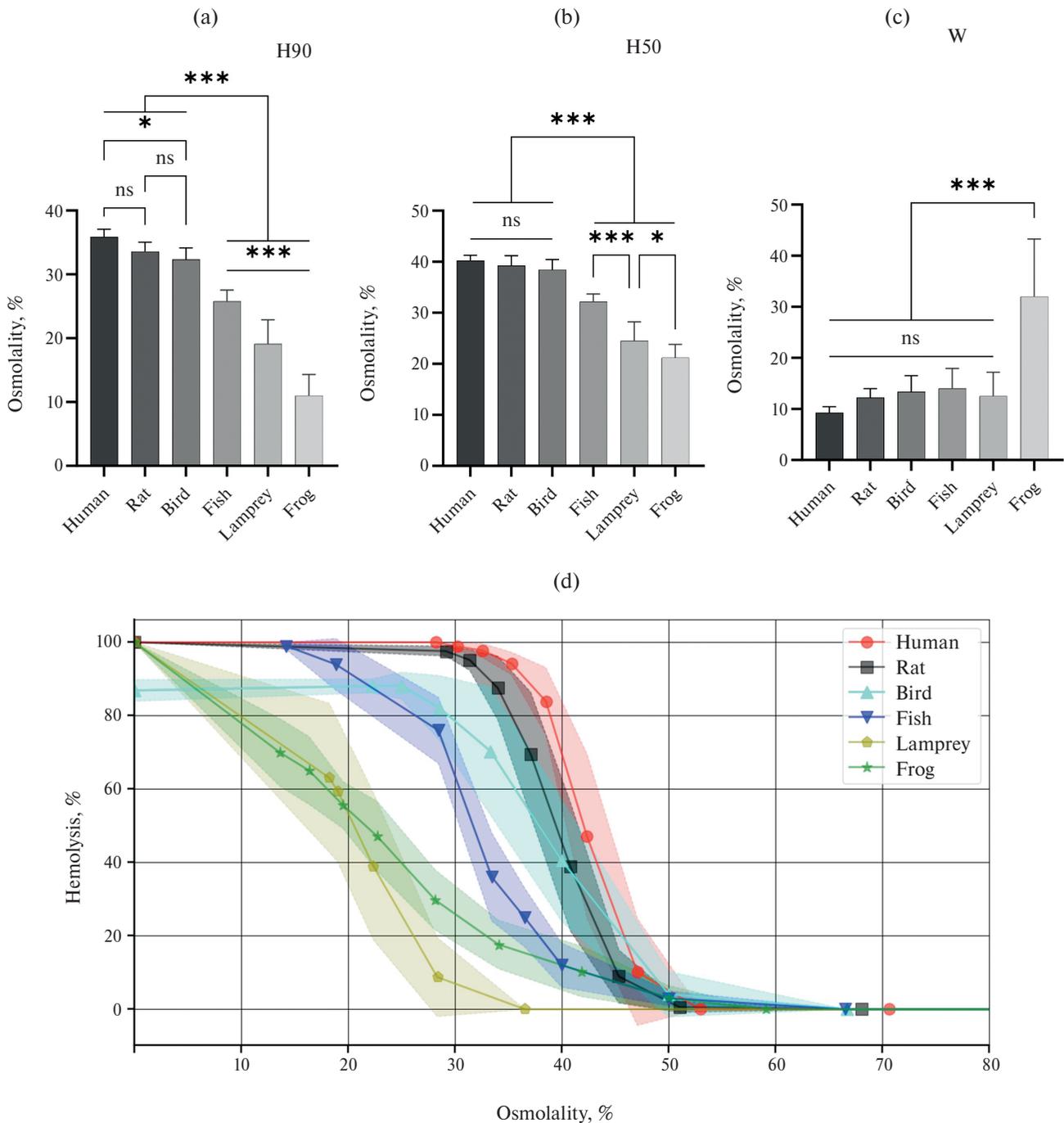
**Рис. 8.** Сравнение осмотической резистентности эритроцитов различных видов позвоночных. (a) — сравнение результатов по  $H_{90}$ . (b) — сравнение по  $H_{50}$ . (c) — сравнение по  $W$ . Температуры: 15°C для *Lampetra fluviatilis* ( $n = 30$ ), 16°C для *Carassius carassius* ( $n = 12$ ), 18°C для *Rana ridibunda* ( $n = 15$ ), 41°C для *Coturnix japonica domestica* ( $n = 6$ ) и 37°C для млекопитающих ( $n = 15$  для *Homo sapiens*,  $n = 7$  для *Rattus norvegicus*). Полупрозрачное облако — стандартное отклонение (sd). ns —  $p > 0.05$ , \* —  $p < 0.05$ , \*\* —  $p < 0.01$ , \*\*\* —  $p < 0.001$ , Tukey's multiple comparisons test. (d) — зависимости процента лизиса (Lys) от осмоляльности среды (Osm). Полупрозрачное облако — стандартное отклонение (sd). Использован мануальный метод лазерной дифракции.

тистически значимые различия выявлены только для  $H_{50}$  по причине высокой дисперсии параметра  $W$  и поправки на множественные сравнения (рис. 8b, c). Для птиц также выявлена устойчивая к гипоосмотическому лизису популяция эритроцитов

( $Lys_{max}$ ), которая составляет для исследованного вида  $13.2 \pm 3.2\%$ . Для эритроцитов амфибий, миног и рыб получены существенно более низкие значения  $H_{50}$  и  $H_{90}$ , чем для эритроцитов птиц и млекопитающих.

Осмоляльность плазмы крови отличается между различными таксонами позвоночных животных, ввиду чего снижение концентрации солей на одну и ту же величину для различных видов ведет к

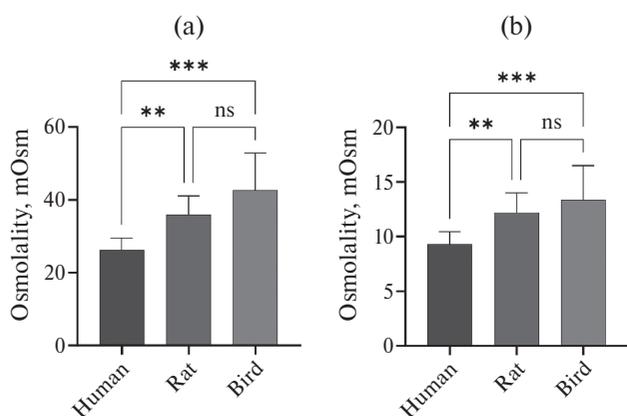
различному падению осмоляльности относительно физиологической. Как следствие, сравнение осмотической резистентности в абсолютных величинах может не отражать действительную устойчивость



**Рис. 9.** Сравнение осмотической резистентности эритроцитов различных видов позвоночных в %-х от исходной осмоляльности. (a) — сравнение результатов по  $H_{90}$ . (b) — сравнение по  $H_{50}$ . (c) — сравнение по W. Температуры и физиологические осмоляльности: 15°C и 260 мОсм для *Lampetra fluviatilis* ( $n = 30$ ), 16°C и 260 мОсм для *Carassius carassius* ( $n = 12$ ), 18°C и 220 мОсм для *Rana ridibunda* ( $n = 15$ ), 41°C и 320 мОсм для *Coturnix japonica* ( $n = 6$ ), 37°C и 283 мОсм для *Homo sapiens* ( $n = 15$ ), 37°C и 294 мОсм для *Rattus norvegicus* ( $n = 7$ ). Полупрозрачное облако — стандартное отклонение (sd). ns —  $p > 0.05$ , \* —  $p < 0.05$ , \*\* —  $p < 0.01$ , \*\*\* —  $p < 0.001$ , Tukey's multiple comparisons test. (d) — зависимости процента лизиса (Lys) от осмоляльности среды (Osm). Полупрозрачное облако — стандартное отклонение (sd). Использован мануальный метод лазерной дифракции.

клеток к перепадам в концентрациях солей относительно их нормальной концентрации. Более осмотически резистентные в абсолютных величинах (mOsm) эритроциты могут быть менее резистентны в величинах относительных (доля или процент от исходной осмоляльности плазмы) и наоборот. Чтобы проверить данную гипотезу, оценили осмотическую резистентность исследуемых таксонов в относительных величинах (рис. 9). При данном подходе различия между эритроцитами птиц и млекопитающих снижаются по  $H_{50}$  и  $W$ , однако статистически значимо возрастают по  $H_{90}$ . Так же возрастают различия по  $H_{50}$  между эритроцитами миног и земноводных. Еще более возрастает гетерогенность ( $W$ ) популяции эритроцитов земноводных относительно гетерогенности эритроцитов других таксонов.

Параметр  $W$  у эритроцитов земноводных обладает значительно большим значением стандартного отклонения (sd) (рис. 8с, рис. 9с). Как следствие, невозможно выявить значимость различий по данному параметру между эритроцитами других исследованных таксонов. Дополнительное сравнение осмотической резистентности эритроцитов высших позвоночных (млекопитающих и птиц) по параметру  $W$  выявило значимые различия между эритроцитами крысы и человека, а также между эритроцитами человека и птиц (как в абсолютных, так и в относительных величинах) (рис. 10а, б). Гетерогенность популяции эритроцитов крыс и птиц не отличается статистически значимо.



**Рис. 10.** Сравнение гетерогенности популяции эритроцитов высших позвоночных по устойчивости к гипоосмотическому лизису. (а) — сравнение в абсолютных величинах (mOsm). (б) — сравнение в относительных величинах (процент от физиологической осмоляльности плазмы). Температуры и физиологические осмоляльности: 41°C и 320 мОсм для *Coturnix japonica* ( $n = 6$ ), 37°C и 283 мОсм для *Homo sapiens* ( $n = 15$ ), 37°C и 294 мОсм для *Rattus norvegicus* ( $n = 7$ ). Использован мануальный метод лазерной дифракции. ns —  $p > 0.05$ , \*\* —  $p < 0.01$ , \*\*\* —  $p < 0.001$ , Tukey's multiple comparisons test.

Эритроциты амфибий наиболее осмотически резистентны по совокупности всех исследованных параметров (как в среднем, то есть по  $H_{50}$ , так и по границам осмоляльностей, в которых протекает гипоосмотический лизис —  $W$ ). Лизис эритроцитов *Rana ridibunda* наблюдается почти сразу после начала снижения осмоляльности от физиологической. Тем не менее, часть популяции клеток лизирует только при очень низких осмоляльностях. Эритроциты миног продемонстрировали более высокую осмотическую резистентность в сравнении с эритроцитами рыб. Высшие позвоночные (млекопитающие и птицы) значительно менее резистентны в сравнении с низшими (миноги, рыбы, амфибии). Различия по осмотической резистентности между эритроцитами птиц и млекопитающих неоднозначны: эритроциты птиц менее устойчивы по значению половинного лизиса в абсолютных величинах, но статистически значимо не отличаются в величинах относительных. Эритроциты *Rattus norvegicus* и *Coturnix japonica* схожи по гетерогенности популяции и существенно превосходят по данному параметру эритроциты человека. Форма лизисной кривой схожа для всех исследованных таксонов, кроме птиц (по причине наличия устойчивой к лизису популяции клеток) и земноводных (более близкая к линейной зависимость, вызванная высокой гетерогенностью).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Осморегуляция — сложный физиологический процесс, заключающийся в поддержании относительного баланса воды и электролитов между внутри- и внеклеточными жидкостями. Осмотическая резистентность эритроцитов, то есть их способность претерпевать изменения осмоляльности плазмы в специфическом для конкретного вида диапазоне, связана с деформируемостью их мембраны [1]. Широко известно, что деформируемость определяется множеством факторов, однако наиболее значимым из них является поддержание структуры спектриновой решетки и стабильности ее связей с мембраной [6]. Различия эритроцитов различных таксонов животных по деформируемости и осмотической резистентности, как следствие, могут быть обусловлены разницей в структуре и составе цитоскелета, степенью фосфорилирования входящих в его состав белков [45]. Механизмы осморегуляции схожи у миног и кистеперых рыб [46], однако эритроциты *Carassius Carassius* оказались существенно менее резистентны, чем эритроциты *Lampetra fluviatilis*. Данная особенность может быть следствием дефицита band 3 в мембране эритроцитов миног, приводящего к слабой связи между цито-

скелетом и мембраной. Кроме того, цитоскелет миног обеднен анкирином, который так же участвует в закреплении цитоскелета на мембрану через анкириновый комплекс [47]. Другой возможной причиной межвидового разнообразия может быть белок 4.1R, который у позвоночных имеет спектрин-актин-связывающий домен (SAB) [48]. Данный белок усиливает связь между актином и спектрином, а его собственная активность зависит от степени фосфорилирования [49]. Кроме того, он связывает фосфатидилсерин, который при дефиците белка 4.1R переходит на внешнюю мембрану эритроцита, дестабилизируя ее [37, 50]. Так же деформируемость зависит от наличия ядра: ядерные клетки обладают дополнительными цитоскелетными связями, проходящими через ядро и микротрубочки, что теоретически может привести к снижению деформируемости [22, 47]. Эритроциты *Carassius Carassius* и эритроциты *Lampetra fluviatilis* являются ядерными, но слабые связи цитоскелета с ядром по причине дефицита band 3 и анкирина, вероятно, могут приводить к меньшему снижению осмотической резистентности у эритроцитов миног [47].

Осмотическая резистентность эритроцитов *Carassius Carassius* и *Lampetra fluviatilis* значительно превосходит резистентность эритроцитов птиц и млекопитающих. Существование в водной среде приводит к развитию особых механизмов осморегуляции. Рыбы живут в постоянном контакте с средой, осмоляльность которой существенно отличается от осмоляльности их плазмы [51]. У пресноводных рыб, включая *Carassius Carassius*, содержание соли в плазме обычно минимум в 100 раз выше, чем в окружающей среде, что компенсируется выработкой большого объема гипотонической мочи [52]. Одно- и двухвалентные ионы реабсорбируются эпителием почек и активно поглощаются через жаберы и кишечник из окружающей среды и пищи [52]. Морские виды рыб, напротив, вынуждены компенсировать потерю воды и накопление неорганических ионов [51]. Так, например, известно, что эритроциты морских рыб менее устойчивы,

чем эритроциты наземных млекопитающих, а эритроциты пресноводных рыб демонстрируют существенно большую устойчивость в сравнении с пресноводными рыбами [53]. Подобная разница между осмотической резистентностью пресноводных и морских животных наблюдается повсеместно: эритроциты большинства морских беспозвоночных обладают низкой осмотической резистентностью [54], для большинства пресноводных видов рыб и амфибий  $H_{50}$  ниже 150 мОсм [55, 56], для морских рыб — значительно выше 160 мОсм [53, 56]. Особенно низкая осмотическая резистентность характерна для хрящевых рыб (акулы и скаты) [56], что объясняется очень высокой осмоляльностью их плазмы крови, достигаемой благодаря использованию мочевины в качестве осмолита [57]. Осмоляльность плазмы хрящевых рыб может превышать осмоляльность морской воды — так, например, известно, что осмоляльность плазмы *Triakidae* составляет 1000 мОсм при осмоляльности морской воды 988 мОсм [58]. Следовательно, эритроциты хрящевых рыб не подвержены дегидратации даже в очень соленых водах [57].

Объем эритроцитов коррелирует с их осмотической устойчивостью. Так, например, эритроциты овец обладают одновременно одними из самых низких значений как MCV, так и осмотической резистентности [59]. Возможная причина: для прохождения по микроциркуляции эритроциты меньшего диаметра не нуждаются в высокой деформируемости в той же степени, в которой она необходима более крупным эритроцитам [60]. Значения MCV для исследованных видов приведены в Таблице 1.

В нашем исследовании различия между эритроцитами *Homo sapiens* и *Rattus norvegicus* по осмоляльности, при которой регистрируется лизис половины клеток, статистически незначимы. В более ранних работах, однако, отмечается, что осмотическая устойчивость эритроцитов крысы значимо ниже, чем у эритроцитов человека, что может быть следствием несоблюдения физиологической температуры проведения эксперимента или большим размером выборки [66]. Тем не менее, построенная лизисная кривая смещена в область более высоких осмоляльностей. Меньшая осмотическая резистентность эритроцитов крыс может быть обусловлена их меньшим объемом в сравнении с эритроцитами человека [64, 66]. Популяция эритроцитов крыс, однако, лизирует в более широких границах осмоляльностей. Известно, что эритроциты крыс обладают меньшей деформируемостью, что обусловлено не только размером их клеток, но и повышенной кальций-индуцированной микровезикуляцией мембраны (в сравнении с эритроцитами человека) [66]. Концентрация внутрикле-

**Таблица 1.** MCV исследованных видов позвоночных\*

Название вида	MCV, fL	Источник
<i>Rana ridibunda</i>	—	[61]
<i>Lampetra fluviatilis</i>	189	[62]
<i>Carassius carassius</i>	242.54 ± 53.28	[63]
<i>Homo sapiens</i>	91.0 ± 5.2	[64]
<i>Rattus norvegicus</i>	61.7 ± 3.6	[64]
<i>Coturnix japonica</i>	136.7 ± 0.7	[65]

\* Виды приведены в порядке роста параметра  $H_{50}$ .

точного кальция в эритроцитах крыс существенно превосходит концентрацию в эритроцитах человека [67]. Кроме того, эритроциты крыс более подвержены влиянию экзогенного кальция [68]. Все наши эксперименты, однако, были выполнены в безкальциевой среде для сохранения постоянства условий для всех исследуемых таксонов, ввиду чего влияние экзогенного кальция на результат исключено.

Наибольшая осмотическая резистентность зарегистрирована у эритроцитов *Rana ridibunda* — вида, относящегося к водным амфибиям. Как уже было отмечено, размер клеток является значимым фактором, существенно влияющим на осмотическую резистентность [59]. Эритроциты амфибий в среднем являются крупнейшими среди эритроцитов позвоночных [69]. Так, например, объем эритроцитов *Pelophylax nigromaculatus* составляет  $1737.5 \pm 299.3$  fL, существенно превышая объем эритроцитов человека ( $90.5 \pm 11.4$  fL) [70]. Известно так же, что эритроциты некоторых видов *Amphiuma* могут достигать объема более 10000 fL [69]. Хотя нет точных данных о объеме эритроцитов *Rana ridibunda*, известны значения MCV для множества других видов лягушек, включая близкородственный вид *Rana dalmatina* ( $486.19 \pm 74.30$  fL) [61]. Форма лизисной кривой у эритроцитов *Rana ridibunda* отличается от сигмоидной (начало лизиса почти в самом начале разбавления, окончание лизиса при очень низких концентрациях осмолитов). Высокая гетерогенность по степени устойчивости, возможно, обусловлена митозом и амитозом эритроцитов в циркуляции крови и, как следствие, высокой дисперсией клеток по размеру [71]. Кроме того, хотя большая часть эритроцитов амфибий обладает ядром, встречаются так же и безъядерные (у некоторых видов *Bolitoglossini* более 80% эритроцитов) [72]. Известно так же, что эритроциты наземных амфибий обладают существенно меньшей осмотической резистентностью, чем эритроциты водных, однако в среднем они более устойчивы, чем эритроциты птиц, рептилий и млекопитающих [20].

Температура также оказывает влияние на осмотическую резистентность и деформируемость эритроцитов всех видов позвоночных [21, 73], что может быть обусловлено реорганизацией цитоскелета и нарушениями функций его белков [74]. Для большинства позвоночных снижение температуры ведет к быстрому снижению устойчивости клеток, однако встречаются и обратные варианты, при которых резистентность растет при падении температуры. Так, например, известно, что эритроциты крыс, кроликов, морских свинок [75], овец и коз [76], домашних куриц и цесарок [73] становятся менее осмотически устойчивы при более низких температурах. Схоже ведут себя и эритроциты ам-

фибий [21]. Однако, встречается и обратная зависимость: эритроциты верблюдов и уток [77] менее устойчивы при повышении температуры, что может быть адаптацией к резким температурным перепадам (резкое похолодание ночью в пустыне, погружение в холодную воду). Экотермные животные нуждаются в особых механизмах защиты эритроцитов от осмотического лизиса вследствие снижения или повышения температуры плазмы, что может быть еще одним фактором, приводящим к развитию повышенной осмотической резистентности их эритроцитов [21]. Исследованные в данной работе экотермные животные (миноги, рыбы, амфибии) обладают значительно более высокой осмотической резистентностью эритроцитов в сравнении эндотермными (млекопитающие, птицы). Особенно выделяются эритроциты амфибий, что может быть вызвано существенным снижением температуры в ходе анабиоза [78, 79].

Известно, что эритроциты различных таксонов могут так же отличаться по доминирующему внутриклеточному катиону. Так, например, в эритроцитах человека, кролика, свиньи, морской свинки и крысы наблюдается повышенная концентрация внутриклеточного калия (клетки НК типа), а в эритроцитах собак, кошек, овец и коров — внутриклеточного натрия (LK тип) [59, 80]. Влияние данного фактора на осмотическую резистентность или объем клеток, однако, не прослеживается. Эритроциты собак относительно крупные (60-75 fL) [81] и одни из наиболее осмотически устойчивых среди эритроцитов млекопитающих [59]. Эритроциты овец — напротив, обладают низким объемом ( $29.0 \pm 0.41$ ) [60] и низкой осмотической резистентностью [59, 76]. Кроме того, наблюдается стабильное увеличение оттока калия из НК клеток при повышении температуры. В случае LK эритроцитов кошек и собак отток натрия обладает максимумом при 37°C [80]. Тем не менее, влияния данного фактора на осмотическую резистентность также, вероятно, несущественно (эритроциты верблюдов относятся к НК типу) [82].

Эритроциты птиц существенно отличаются от эритроцитов млекопитающих.  $13.2 \pm 3.2\%$  эритроцитов *Coturnix japonica domestica* не подвержены гипосмотическому лизису. Тем не менее, степень гемолиза эритроцитов птиц может варьироваться в зависимости от резкости перехода с высокой на более низкую осмоляльность [22]. Показано, что эритроциты домашней курицы не лизируют до 100% при разведении в чистой воде, однако лизируют в мягких гипотонических условиях [22]. В данной работе осмоляльность снижалась в одной кювете (пробирке) с лагом приблизительно 2 минуты, процент лизиса фиксировался после каждого

шага разбавления. Половинный лизис для эритроцитов птиц оценивался, как лизис половины той части популяции клеток, которая подвержена гипоосмотическому лизису. При данном подходе эритроциты *Coturnix japonica domestica* демонстрируют меньшую осмотическую устойчивость в сравнении эритроцитами млекопитающих по осмоляльности, соответствующей половинному лизису. Эритроциты *Coturnix japonica domestica* обладают овальной формой, содержат ядро и митохондрии [83], что может быть причиной их сниженной устойчивости. Так, например, известно, что эритроциты тех птиц, клетки которых имеют более шарообразную и близкую к эритроцитам млекопитающих форму, менее подвержены гипоосмотическому лизису [83]. Тем не менее, эритроциты *Coturnix japonica domestica* нельзя однозначно назвать менее осмотически резистентными в сравнении с эритроцитами человека и крысы ввиду существенно более широких границ осмоляльностей, при которых наблюдается лизис, а также наличия устойчивой к лизису части популяции клеток. Возможно, что причина резистентности эритроцитов птиц к гемолизу в чистой воде, а так же причина вариативности степени лизиса от разбавления среды, заключаются в наличии обнаруженных в мембране эритроцитов курицы неактивных/нефункциональных аквапоринов, которые необходимы для адаптации к длительным перелетам, в ходе которых птицы потребляют только бессолеую влагу [22, 84].

Состав жирных кислот фосфолипидного бислоя эритроцитов является одним из факторов, влияющих на текучесть мембраны, однако в исследованиях последних лет было показано, что деформируемость/гибкость мембраны эритроцитов в первую очередь определяется структурой цитоскелета клеток и, в меньшей степени, составом самого фосфолипидного бислоя. Именно цитоскелет определяет морфологию, размер и биомеханические свойства мембран эритроцитов [85, 86]. У животных данных по осмотической устойчивости эритроцитов значительно меньше, но для них также предполагается преимущественное влияние цитоскелета на биофизические свойства мембраны эритроцитов. Например, эритроциты курицы были отмечены как более устойчивые к гидродинамическому разрушению по сравнению с эритроцитами рыбы, что было связано с повышенным содержанием спектрина [87]. При исследовании влияния жирнокислотного состава мембран эритроцитов у разных животных, был сделан вывод, что что бислой жирных кислот является второстепенным фактором, влияющим на гибкость эритроцитов, в части их влияния на текучесть мембраны [88].

Результаты проведенного исследования показали, что эритроциты пресноводных низших позвоночных (рыбы, многои, амфибии) в среднем обладают большей осмотической резистентностью в сравнении с эритроцитами высших (птицы, млекопитающие). Работы, в которых рассматривались пресмыкающиеся, так же подтверждают наши результаты, хотя пресмыкающиеся и занимают промежуточное положение по степени устойчивости эритроцитов [20]. Подобная градация может быть обусловлена следующими основными факторами.

1) Осмотическая резистентность зависит от температуры как для эндотермных животных, так и для эктотермных [21]. Повышенная осмотическая устойчивость эндотермных животных позволяет компенсировать ту разницу в резистентности, которая возникает из-за значительных перепадов температур. 2) Так как кожа пресмыкающихся (в отличие от кожи амфибий) водонепроницаема, не только наземные, но и околводные рептилии менее зависимы от количества солей, растворенных в воде. Как следствие, у них нет необходимости в механизмах, обеспечивающих сопоставимо высокую осмотическую резистентность клеток. 3) Так как раннее развитие анэмний всегда протекает в водной среде, они особенно остро нуждаются в возможности обеспечить высокую устойчивость эритроцитов к колебаниям осмоляльности, в то время как амниоты, включая пресмыкающихся, защищены от прямого воздействия водной среды на ранних стадиях жизненного цикла. Тем не менее, предложенной закономерности не подчиняются морские низшие позвоночные, для которых характерна сниженная осмотическая резистентность по причине высокой концентрации растворенных в воде солей.

Представленный и апробированный в данной работе метод лазерной дифракции позволил количественно оценить осмотическую устойчивость эритроцитов человека и животных при соблюдении физиологических температур для каждого исследованного таксона, что было затруднено или невозможно при использовании проточной цитометрии [34], спектрофотометрии [33], эктацитометрии [23] или оценке гипоосмотического лизиса в микроканалах [35]. Разработанный метод, возможно, обладает большим клиническим и исследовательским потенциалом, чем спектральный тест на осмотическую резистентность и цитометрический метод Won и Suh. Спектральный тест опирается на графическое нахождение зависимости процента лизированных клеток от осмоляльности. Цитометрический метод, предложенный Won и Suh, позволяет определить лишь отношения количества клеток до и после разбавления раствора. Мы предлагаем математическое описание процесса гипоосмотиче-

ского лизиса эритроцитов, при котором возможен численный расчет процента лизиса при любой заданной осмоляльности. Описанный математический алгоритм характеристики осмотической резистентности применим не только для обработки данных, полученных с помощью лазерного анализатора, но и для исследований, проводимых на спектрофотометре или проточном цитометре, что способствует унификации получаемых результатов и, как следствие, к возможности сравнения данных, получаемых в различных лабораториях. Контрольные эксперименты по модифицированным методам проточной цитометрии и спектрофотометрии дали результаты, близкие к результатам мануального метода лазерной дифракции, а полученные при помощи последнего данные о осмотической резистентности эритроцитов животных совпадают с данными ранее проведенных исследований близких таксонов. Результаты автоматического метода лазерной дифракции коррелируют с результатами мануального метода. Кроме того, в дальнейшем также планируется модификация протокола автоматического метода, которая позволит по результатам одного эксперимента получить не только информацию о осмотической резистентности эритроцитов, но зависимости изменения их формы и объема от осмоляльности среды [36]. На текущий момент опубликовано достаточно мало сравнительных исследований, посвященных осмотической резистентности эритроцитов различных животных, а имеющиеся данные часто получены при использовании различных сред, температур, рН, различных методов анализа и обработки данных. Разработанный протокол позволит унифицировать подход к оценке осмотической резистентности эритроцитов, а также существенно сократить время проведения исследования. Важной областью приложения фундаментальных исследований состояния клеток крови различных классов животных также является мониторинг состояния окружающей среды. Воздействие загрязнителей из сточных вод [89], попадание в среду фармакологических препаратов [90], аноксия, осмотический стресс и другие факторы могут приводить к изменению функции клеток [91]. С этой точки зрения данные о нормальном физиологическом ответе эритроцитов различных видов животных и человека на осмотический стресс могут в дальнейшем служить референсным уровнем при экологических исследованиях.

По результатам проделанной работы можно сделать следующие выводы:

Пресноводные низшие позвоночные (рыбы, млекопитающие) обладают более осмотически резистентными эритроцитами, чем высшие позвоночные (птицы, млекопитающие).

Показаны преимущества метода лазерной дифракции для оценки биофизических параметров эритроцитов (скорость гемолиза, завершенность гемолиза, степень гетерогенности популяции клеток по степени устойчивости к гипоосмотической среде) по сравнению с методами спектрофотометрии и проточной цитометрии.

Разработаны температурные протоколы для проведения гипоосмотического теста у различных видов животных.

#### ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и дизайн эксперимента (Б.А.Г., И.В.М.), постановка экспериментов (Б.А.Г., А.Ю.А., А.А.В.), сбор данных (Б.А.Г., А.Ю.А., Е.А.С., А.А.В.), обработка данных (Б.А.Г., А.Ю.А.), написание и редактирование текста (Б.А.Г., Е.А.С., И.В.М., С.П.Г.).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям комиссии по биоэтике ИЭФБ РАН (протокол №1-2/ 2024 заседания №1 Комиссии по Биоэтике от 31.01.2024 г., утвержденный Приказом Директора ИЭФБ РАН №8 от 30.01.2024 г.).

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Все процедуры так же одобрены комиссией по биоэтике ИЭФБ РАН (протокол N 1–04 от 7 апреля 2022).

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работы, связанные с лазерной дифракцией, поддержаны грантом РНФ 23-15-00142. Работы с животными поддержаны гос. заданием № 075-00264-24-00.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Huisjes R, Bogdanova A, van Solinge WW, Schiffelers RM, Kaestner L, van Wijk R (2018) Squeezing for Life — Properties of Red Blood Cell Deformability. *Front Physiol* 9:656. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00656>

2. *Skverchinskaya E, Levdarovich N, Ivanov A, Mindukshev I, Bukatin A* (2023) Anticancer Drugs Paclitaxel, Carboplatin, Doxorubicin, and Cyclophosphamide Alter the Biophysical Characteristics of Red Blood Cells, *in vitro*. *Biology* (Basel) 12:230.  
<https://doi.org/10.3390/biology12020230>
3. *Orbach A, Zelig O, Yedgar S, Barshtein G* (2017) Biophysical and Biochemical Markers of Red Blood Cell Fragility. *Transfus Med Hemother* 44:183–187.  
<https://doi.org/10.1159/000452106>
4. *Baskurt OK, Meiselman HJ* (2003) Blood rheology and hemodynamics. *Semin Thromb Hemost* 29:435–450.  
<https://doi.org/10.1055/s-2003-44551>
5. *Ok B* (2008) In vivo correlates of altered blood rheology. *Biorheology* 45:
6. *Lux SE* (2016) Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. *Blood* 127:187–199.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-512772>
7. *Mohandas N, Gallagher PG* (2008) Red cell membrane: past, present, and future. *Blood* 112:3939–3948.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-161166>
8. *Klei TRL, Meinderts SM, van den Berg TK, van Bruggen R* (2017) From the Cradle to the Grave: The Role of Macrophages in Erythropoiesis and Erythrophagocytosis. *Front Immunol* 8:  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00073>
9. *Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N* (2008) Hereditary spherocytosis. *Lancet* 372:1411–1426.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61588-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61588-3)
10. *Vayá A, Suescun M, Pardo A, Fuster O* (2014) Erythrocyte deformability and hereditary elliptocytosis. *Clin Hemorheol Microcirc* 58:471–473.  
<https://doi.org/10.3233/CH-141889>
11. *Glogowska E, Lezon-Geyda K, Maksimova Y, Schulz VP, Gallagher PG* (2015) Mutations in the Gardos channel (KCNN4) are associated with hereditary xerocytosis. *Blood* 126:1281–1284.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2015-07-657957>
12. *Bunyaratvej A, Butthep P, Sae-Ung N, Fucharoen S, Yuthavong Y* (1992) Reduced Deformability of Thalassaemic Erythrocytes and Erythrocytes With Abnormal Hemoglobins and Relation With Susceptibility to Plasmodium falciparum Invasion. *Blood* 79:2460–2463.  
<https://doi.org/10.1182/blood.V79.9.2460.2460>
13. *Vayá A, Collado S, Dasí MA, Pérez ML, Hernandez JL, Barragán E* (2014) Erythrocyte deformability and aggregation in homozygous sickle cell disease. *Clin Hemorheol Microcirc* 58:497–505.  
<https://doi.org/10.3233/CH-131717>
14. *Mercke CE* (1981) Anaemia in patients with solid tumours and the role of erythrocyte deformability. *Br J Cancer* 44:425–432
15. *Piagnerelli M, Boudjeltia KZ, Vanhaeverbeek M, Vincent J-L* (2003) Red blood cell rheology in sepsis. *Intensive Care Med* 29:1052–1061.  
<https://doi.org/10.1007/s00134-003-1783-2>
16. *Nemeth N, Peto K, Magyar Z, Klarik Z, Varga G, Oltean M, Mantas A, Czigany Z, Tolba RH* (2021) Hemorheological and Microcirculatory Factors in Liver Ischemia-Reperfusion Injury—An Update on Pathophysiology, Molecular Mechanisms and Protective Strategies. *International Journal of Molecular Sciences* 22:1864.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22041864>
17. *Varga A, Matrai AA, Barath B, Deak A, Horvath L, Nemeth N* (2022) Interspecies Diversity of Osmotic Gradient Deformability of Red Blood Cells in Human and Seven Vertebrate Animal Species. *Cells* 11:1351.  
<https://doi.org/10.3390/cells11081351>
18. *Waymouth C* (1970) Osmolality of mammalian blood and of media for culture of mammalian cells. *In Vitro* 6:109–127.  
<https://doi.org/10.1007/BF02616113>
19. *Matrai AA, Varga G, Tanczos B, Barath B, Varga A, Horvath L, Bereczky Z, Deak A, Nemeth N* (2021) In vitro effects of temperature on red blood cell deformability and membrane stability in human and various vertebrate species. *Clin Hemorheol Microcirc* 78:291–300.  
<https://doi.org/10.3233/CH-211118>
20. *Aldrich K, Saunders D, Sievert L, Sievert G* (2006) Comparison of erythrocyte osmotic fragility among amphibians, reptiles, birds and mammals. *Transactions of the Kansas Academy of Science* 109:149–158.  
[https://doi.org/10.1660/0022-8443\(2006\)109\[149:COE-OFA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1660/0022-8443(2006)109[149:COE-OFA]2.0.CO;2)
21. *Aldrich K, Saunders DK* (2001) Comparison of erythrocyte osmotic fragility among ectotherms and endotherms at three temperatures. *Journal of Thermal Biology* 26:179–182.  
[https://doi.org/10.1016/S0306-4565\(00\)00040-1](https://doi.org/10.1016/S0306-4565(00)00040-1)
22. *Singh S, Ponnappan N, Verma A, Mittal A* (2019) Osmotic tolerance of avian erythrocytes to complete hemolysis in solute free water. *Sci Rep* 9:7976.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-44487-7>
23. *Dobbe JGG, Hardeman MR* (2006) Red blood cell aggregation as measured with the LORCA. *Int J Artif Organs* 29:641–642; author reply 643
24. *Shin S, Hou JX, Suh JS, Singh M* (2007) Validation and application of a microfluidic ektacytometer (RheoScan-D) in measuring erythrocyte deformability. *Clin Hemorheol Microcirc* 37:319–328
25. *Dobbe JGG, Streekstra GJ, Hardeman MR, Ince C, Grimbergen CA* (2002) Measurement of the distribution of red blood cell deformability using an automated rheoscope. *Cytometry* 50:313–325.  
<https://doi.org/10.1002/cyto.10171>
26. *Föller M, Geiger C, Mahmud H, Nicolay J, Lang F* (2008) Stimulation of suicidal erythrocyte death by amantadine. *Eur J Pharmacol* 581:13–18.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.11.051>

27. *Hunt L, Greenwood D, Heimpel H, Noel N, Whiteway A, King M-J* (2015) Toward the harmonization of result presentation for the eosin-5'-maleimide binding test in the diagnosis of hereditary spherocytosis. *Cytometry B Clin Cytom* 88:50–57. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21187>
28. *Yeow N, Tabor RF, Garnier G* (2017) Atomic force microscopy: From red blood cells to immunohaematology. *Adv Colloid Interface Sci* 249:149–162. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.05.011>
29. *Waugh RE, Narla M, Jackson CW, Mueller TJ, Suzuki T, Dale GL* (1992) Rheologic properties of senescent erythrocytes: loss of surface area and volume with red blood cell age. *Blood* 79:1351–1358
30. *Lubiana P, Bouws P, Roth LK, Dörpinghaus M, Rehn T, Brehmer J, Wichers JS, Bachmann A, Höhn K, Roeder T, Thye T, Gutschmann T, Burmester T, Bruchhaus I, Metwalley NG* (2020) Adhesion between *P. falciparum* infected erythrocytes and human endothelial receptors follows alternative binding dynamics under flow and febrile conditions. *Sci Rep* 10:4548. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61388-2>
31. *Cluitmans JCA, Chokkalingam V, Janssen AM, Brock R, Huck WTS, Bosman GJCGM* (2014) Alterations in red blood cell deformability during storage: a microfluidic approach. *Biomed Res Int* 2014:764268. <https://doi.org/10.1155/2014/764268>
32. *Oonishi T, Sakashita K, Uyesaka N* (1997) Regulation of red blood cell filterability by Ca<sup>2+</sup> influx and cAMP-mediated signaling pathways. *Am J Physiol* 273:C1828–1834. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.273.6.C1828>
33. *Parpart AK, Lorenz PB, Parpart ER, Gregg JR, Chase AM* (1947) THE OSMOTIC RESISTANCE (FRAGILITY) OF HUMAN RED CELLS 1. *J Clin Invest* 26:636–640
34. *Won DI, Suh JS* (2009) Flow cytometric detection of erythrocyte osmotic fragility. *Cytometry B Clin Cytom* 76:135–141. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20448>
35. *Zhan Y, Loufakis DN, Bao N, Lu C* (2012) Characterizing osmotic lysis kinetics under microfluidic hydrodynamic focusing for erythrocyte fragility studies. *Lab Chip* 12:5063–5068. <https://doi.org/10.1039/c2lc40522a>
36. *Mindukshev IV, Krivoslyk VV, Ermolaeva EE, Dobrylko IA, Senchenkov EV, Goncharov NV, Jenkins RO, Krivchenko AI* (2007) Necrotic and apoptotic volume changes of red blood cells investigated by low-angle light scattering technique. *Journal of Spectroscopy* 21:105–120. <https://doi.org/10.1155/2007/629870>
37. *Sudnitsyna J, Skverchinskaya E, Dobrylko I, Nikitina E, Gambaryan S, Mindukshev I* (2020) Microvesicle Formation Induced by Oxidative Stress in Human Erythrocytes. *Antioxidants (Basel)* 9:929. <https://doi.org/10.3390/antiox9100929>
38. *Deckardt K, Weber I, Kaspers U, Hellwig J, Tennekes H, van Ravenzwaay B* (2007) The effects of inhalation anaesthetics on common clinical pathology parameters in laboratory rats. *Food Chem Toxicol* 45:1709–1718. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.03.005>
39. *Bonnet X, Billy G, Lakušić M* (2020) Puncture versus capture: which stresses animals the most? *J Comp Physiol B* 190:341–347. <https://doi.org/10.1007/s00360-020-01269-2>
40. *Goodhead LK, MacMillan FM* (2017) Measuring osmosis and hemolysis of red blood cells. *Adv Physiol Educ* 41:298–305. <https://doi.org/10.1152/advan.00083.2016>
41. *Fujii H, Nishikawa K, Na H, Inoue Y, Kobayashi K, Watanabe M* (2023) Numerical study of light scattering and propagation in soymilk: Effects of particle size distributions, concentrations, and medium sizes. *Infrared Physics & Technology* 132:104753. <https://doi.org/10.1016/j.infrared.2023.104753>
42. *Crump KS, Hoel DG, Langley CH, Peto R* (1976) Fundamental carcinogenic processes and their implications for low dose risk assessment. *Cancer Res* 36:2973–2979
43. *Virtanen P, Gommers R, Oliphant TE, Haberland M, Reddy T, Cournapeau D, Burovski E, Peterson P, Weckesser W, Bright J, van der Walt SJ, Brett M, Wilson J, Millman KJ, Mayorov N, Nelson ARJ, Jones E, Kern R, Larson E, Carey CJ, Polat İ, Feng Y, Moore EW, VanderPlas J, Laxalde D, Perktold J, Cimrman R, Henriksen I, Quintero EA, Harris CR, Archibald AM, Ribeiro AH, Pedregosa F, van Mulbregt P, SciPy 1.0 Contributors* (2020) SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nat Methods* 17:261–272. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0686-2>
44. *Mindukshev IV, Skverchinskaya EA, Khmelevskoy DA, Dobrylko IA, Goncharov NV* (2019) Acetylcholinesterase Inhibitor Paraoxon Intensifies Oxidative Stress Induced in Rat Erythrocytes In Vitro. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology* 1:85–91. <https://doi.org/10.1134/S1990747819010070>
45. *Nemeth N, Sogor V, Kiss F, Ulker P* (2016) Interspecies diversity of erythrocyte mechanical stability at various combinations in magnitude and duration of shear stress, and osmolality. *Clin Hemorheol Microcirc* 63:381–398. <https://doi.org/10.3233/CH-152031>
46. *Ferreira-Martins D, Wilson JM, Kelly SP, Kolosov D, McCormick SD* (2021) A review of osmoregulation in lamprey. *Journal of Great Lakes Research* 47:S59–S71. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2021.05.003>
47. *Hägerstrand H, Danieluk M, Bobrowska-Hägerstrand M, Iglíč A, Wróbel A, Isomaa B, Nikinmaa M* (2000) Influence of band 3 protein absence and skeletal structures on amphiphile- and Ca<sup>2+</sup>-induced shape alterations in erythrocytes: a study with lamprey (*Lampetra fluviatilis*), trout (*Onchorhynchus mykiss*) and human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Biomembranes* 1466:125–138. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00184-X](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00184-X)

48. *Tang F, Lei X, Xiong Y, Wang R, Mao J, Wang X* (2014) Alteration Young's moduli by protein 4.1 phosphorylation play a potential role in the deformability development of vertebrate erythrocytes. *J Biomech* 47:3400–3407. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2014.07.022>
49. *Baines AJ, Lu H-C, Bennett PM* (2014) The Protein 4.1 family: Hub proteins in animals for organizing membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1838:605–619. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.05.030>
50. *Jeremy KP, Plummer ZE, Head DJ, Madgett TE, Sanders KL, Wallington A, Storry JR, Gilsanz F, Delaunay J, Avent ND* (2009) 4.1R-deficient human red blood cells have altered phosphatidylserine exposure pathways and are deficient in CD44 and CD47 glycoproteins. *Haematologica* 94:1354–1361. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.006585>
51. *Evans TG* (2010) Co-ordination of osmotic stress responses through osmosensing and signal transduction events in fishes. *J Fish Biol* 76:1903–1925. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02590.x>
52. *Al-Jandal NJ, Wilson RW* (2011) A comparison of osmoregulatory responses in plasma and tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following acute salinity challenges. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 159:175–181. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.02.016>
53. *Ezell GH, Sulya LL, Dodgen CL* (1969) The osmotic fragility of some fish erythrocytes in hypotonic saline. *Comparative Biochemistry and Physiology* 28:409–415. [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(69\)91354-1](https://doi.org/10.1016/0010-406X(69)91354-1)
54. *Demanche R* (1980) The Osmotic Fragility Of Red Blood Cells Of Marine Animals: A Comparative Study. <https://doi.org/10.21220/S2-1JMC-WK51>
55. *Kim HD, Isaacks RE* (1978) The osmotic fragility and critical hemolytic volume of red blood cells of Amazon fishes. *Can J Zool* 56:860–862. <https://doi.org/10.1139/z78-118>
56. *Lewis JH, Ferguson EE* (1966) Osmotic fragility of pre-mammalian erythrocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 18:589–595. [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(66\)90242-8](https://doi.org/10.1016/0010-406X(66)90242-8)
57. *Hyodo S, Kakumura K, Takagi W, Hasegawa K, Yamaguchi Y* (2014) Morphological and functional characteristics of the kidney of cartilaginous fishes: with special reference to urea reabsorption. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 307:R1381–R1395. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00033.2014>
58. *Hyodo S, Tsukada T, Takei Y* (2004) Neurohypophysial hormones of dogfish, *Triakis scyllium*: structures and salinity-dependent secretion. *Gen Comp Endocrinol* 138:97–104. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.05.009>
59. *Coldman MF, Gent M, Good W* (1970) Relationships between osmotic fragility and other species-specific variables of mammalian erythrocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 34:759–772. [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(70\)90997-7](https://doi.org/10.1016/0010-406X(70)90997-7)
60. *Baskurt OK* (1996) Deformability of red blood cells from different species studied by resistive pulse shape analysis technique. *Biorheology* 33:169–179. [https://doi.org/10.1016/0006-355X\(96\)00014-5](https://doi.org/10.1016/0006-355X(96)00014-5)
61. *Gül Ç, Tosunoğlu M, Erdoğan D* (2011) Changes in the blood composition of some anurans. *Acta Herpetologica* 6:137–147. [https://doi.org/10.13128/Acta\\_Herpetol-9137](https://doi.org/10.13128/Acta_Herpetol-9137)
62. *Potter IC, Percy LR, Barber DL, Macey DJ* (1982) The morphology, development and physiology of blood cells. In: *Hardisty MW, Potter IC* (eds) *The Biology of Lampreys*. Academic Press, London, p V4A: 233–292
63. *Suljević D, Alijagić A, Mitrašinić-Brulić M, Focak M, Islamagic E* (2017) Comparative physiological assessment of common carp (*Cyprinus carpio*) and crucian carp (*Carrasius carassius*) based on electrolyte and hematological analysis. *Macedon. J. Animal Sci.* 6:95–100. <https://doi.org/10.54865/mjas1662095s>
64. *Chen D, Kaul DK* (1994) Rheologic and hemodynamic characteristics of red cells of mouse, rat and human. *Biorheology* 31:103–113. <https://doi.org/10.3233/bir-1994-31109>
65. *Sujata P, Mohanty PK, Mallik BK* (2014) Haematological analyses of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) at different stages of growth. *Res. J. Chem. Sci.* ISSN 2231:606X
66. *da SilveiraCavalcante L, Acker JP, Holovati JL* (2015) Differences in Rat and Human Erythrocytes Following Blood Component Manufacturing: The Effect of Additive Solutions. *Transfus Med Hemother* 42:150–157. <https://doi.org/10.1159/000371474>
67. *Morris MJ, David-Duflho M, Devynck MA* (1988) Red blood cell ionized calcium concentration in spontaneous hypertension: modulation in vivo by the calcium antagonist PN 200.110. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 15:257–260. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1988.tb01068.x>
68. *Swislocki NI, Tierney JM* (1989) Different sensitivities of rat and human red cells to exogenous Ca<sup>2+</sup>. *Am J Hematol* 31:1–10. <https://doi.org/10.1002/ajh.2830310102>
69. *Glomski CA, Tamburlin J, Hard R, Chainani M* (1997) The phylogenetic odyssey of the erythrocyte. IV. The amphibians. *Histol Histopathol* 12:147–170
70. *Kim G, Lee M, Youn S, Lee E, Kwon D, Shin J, Lee S, Lee YS, Park Y* (2018) Measurements of three-dimensional refractive index tomography and membrane deformability of live erythrocytes from *Pelophylax nigromaculatus*. *Sci Rep* 8:9192. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25886-8>
71. *Chen X, Wu Y, Huang L, Cao X, Hanif M, Peng F, Wu X, Zhang S* (2022) Morphology and cytochemical patterns of

- peripheral blood cells of tiger frog (*Rana rugulosa*). PeerJ 10:e13915.  
<https://doi.org/10.7717/peerj.13915>
72. *Villolobos M, León P, Sessions SK, Kezer J* (1988) Enucleated Erythrocytes in Plethodontid Salamanders. *Herpetologica* 44:243–250
73. *Oyewale JO* (1992) Effects of temperature and pH on osmotic fragility of erythrocytes of the domestic fowl (*Gallus domesticus*) and guinea-fowl (*Numida meleagris*). *Res Vet Sci* 52:1–4.  
[https://doi.org/10.1016/0034-5288\(92\)90049-8](https://doi.org/10.1016/0034-5288(92)90049-8)
74. *Parshina EY, Yusipovich AI, Brazhe AR, Silicheva MA, Maksimov GV* (2019) Heat damage of cytoskeleton in erythrocytes increases membrane roughness and cell rigidity. *J Biol Phys* 45:367–377.  
<https://doi.org/10.1007/s10867-019-09533-5>
75. *Aloni B, Eitan A, Livne A* (1977) The erythrocyte membrane site for the effect of temperature on osmotic fragility. *Biochim Biophys Acta* 465:46–53.  
[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(77\)90354-6](https://doi.org/10.1016/0005-2736(77)90354-6)
76. *Oyewale JO* (1991) Osmotic fragility of erythrocytes of west African dwarf sheep and goats: effects of temperature and pH. *Br Vet J* 147:163–170.  
[https://doi.org/10.1016/0007-1935\(91\)90107-X](https://doi.org/10.1016/0007-1935(91)90107-X)
77. *Oyewale JO, Sanni AA, Ajibade HA* (1991) Effects of temperature, pH and blood storage on osmotic fragility of duck erythrocytes. *Zentralbl Veterinarmed A* 38:261–264.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1991.tb01011.x>
78. *Skorkina MI, Derkachev RV* (2010) [Seasonal activity of frog *Rana ridibunda* erythrocytes by data of electrophoretic mobility]. *Zh Evol Biokhim Fiziol* 46:134–137
79. *Jørgensen C* (2008) Osmotic Regulation in the Frog, *Kana Esculenta* (L.), at Low Temperatures. *Acta Physiologica Scandinavica* 20:46–55.  
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1950.tb00680.x>
80. *Zeidler RB, Kim HD* (1979) Effects of low electrolyte media on salt loss and hemolysis of mammalian red blood cells. *J Cell Physiol* 100:551–561.  
<https://doi.org/10.1002/jcp.1041000317>
81. *Kumiega E, Michałek M, Kasztura M, Noszczyk-Nowak A* (2020) Analysis of Red Blood Cell Parameters in Dogs with Various Stages of Degenerative Mitral Valve Disease. *J Vet Res* 64:325–332.  
<https://doi.org/10.2478/jvetres-2020-0043>
82. *Gharaibeh NS, Rawashdeh NM* (1993) Volume-Dependent Potassium Transport in Camel Red Blood Cells. *Membrane Biochemistry* 10:99–106.  
<https://doi.org/10.3109/09687689309150257>
83. *Viscor G, Palomeque J* (1982) Method for determining the osmotic fragility curves of erythrocytes in birds. *Laboratory Animals* 16:48–50
84. *Benga G* (2009) Water channel proteins (later called aquaporins) and relatives: past, present, and future. *IUBMB Life* 61:112–133.  
<https://doi.org/10.1002/iub.156>
85. *Diez-Silva M, Dao M, Han J, Lim C-T, Suresh S* (2010) Shape and Biomechanical Characteristics of Human Red Blood Cells in Health and Disease. *MRS Bull* 35:382–388.  
<https://doi.org/10.1557/mrs2010.571>
86. *Barshtein G, Gural A, Arbell D, Barkan R, Livshits L, Pajic-Lijakovic I, Yedgar S* (2023) Red Blood Cell Deformability Is Expressed by a Set of Interrelated Membrane Proteins. *Int J Mol Sci* 24:12755.  
<https://doi.org/10.3390/ijms241612755>
87. *Cassoly R, Stetzkowski-Marden F, Scheuring U* (1989) A mixing chamber to enucleate avian and fish erythrocytes: preparation of their plasma membrane. *Anal Biochem* 182:71–76.  
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90720-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90720-3)
88. *Plasenzotti R, Windberger U, Ulberth F, Osterode W, Losert U* (2007) Influence of fatty acid composition in mammalian erythrocytes on cellular aggregation. *Clin Hemorheol Microcirc* 37:237–243
89. *Вафис АА, Пескова ТЮ* (2009) Реакции крови озерной лягушки *Rana ridibunda* pal. на воздействие сточных вод сахарных заводов. Вопросы современной науки и практики Университет им ВИ Вернадского. [Vafis AA, Peskova TY (2009) Blood reactions of the lake frog *Rana ridibunda* pal. on the impact of wastewater from sugar factories. Voprosy sovremennoi nauki i praktiki Universitet im VI Vernadskogo (In Russ)]
90. *Vijitkul P, Kongsema M, Toommakorn T, Bullangpoti V* (2022) Investigation of genotoxicity, mutagenicity, and cytotoxicity in erythrocytes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after fluoxetine exposure. *Toxicology Reports* 9:588–596.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.03.031>
91. *Giraud-Billoud M, Moreira DC, Minari M, Andreyeva A, Campos ÉG, Carvajalino-Fernández JM, Istomina A, Michaelidis B, Niu C, Niu Y, Ondei L, Prokić M, Rivera-Ingraham GA, Sahoo D, Staikou A, Storey JM, Storey KB, Vega IA, Hermes-Lima M* (2024) REVIEW: Evidence supporting the ‘preparation for oxidative stress’ (POS) strategy in animals in their natural environment. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 293:111626.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2024.111626>

## COMPARATIVE ANALYSIS OF THE OSMOTIC FRAGILITY OF ERYTHROCYTES ACROSS VARIOUS TAXA OF VERTEBRATES

**B. A. Gerda<sup>a, #</sup>, E. A. Skverchinskaya<sup>a</sup>, A. Y. Andreeva<sup>a, b</sup>, A. A. Volkova<sup>a</sup>,  
S. Gambaryan<sup>a</sup> and I. V. Mindukshev<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry  
of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian*

<sup>b</sup> *A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian*

<sup>#</sup> *e-mail: bgergda2525@gmail.com*

The osmotic fragility of erythrocytes serves as a crucial parameter indicating the cells' ability to endure variations in the osmotic environment. Disorders in this attribute are often correlated with a spectrum of pathologies, encompassing hemolytic anemias, malignant tumors, and cardiovascular dysfunctions. Notably, osmotic fragility exhibits variability across different animal species and closely intertwines with their respective ecosystems. A methodology for assessing osmotic fragility has been devised utilizing a laser particle analyzer, facilitating the real-time monitoring of cell concentration changes under controlled temperature conditions. The species examined include *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus domestica*, *Coturnix japonica domestica*, *Rana ridibunda*, *Carassius carassius*, and *Lampetra fluviatilis*. The methodology is presented in two variants: (1) manual water additions and (2) automated medium dilution. Key parameters characterizing osmotic fragility include  $H_{50}$  (the osmolality causing lysis in half of the susceptible cells),  $H_{90}$  (lysis in 90% of the cells), and W (heterogeneity in lysis fragility within the cell population). The findings obtained through the developed method did not show statistically significant deviations from the results obtained using spectrophotometry and flow cytometry concerning parameters such as  $H_{50}$  and W. Moreover, no noteworthy disparities were observed between the outcomes of the automatic and manual methodologies. Erythrocytes of aquatic and semi-aquatic animals exhibit significantly higher resistance to hypotonic lysis. Among all species examined, amphibian (*Rana ridibunda*) and lamprey (*Lampetra fluviatilis*) erythrocytes demonstrated the lowest osmotic fragility. The most pronounced variability in resistance levels was detected among amphibians, with differences nearly doubling in comparison to other taxa examined. While mammalian erythrocytes (including those of humans and rats) exhibited similar fragility levels, they displayed less uniformity in their resistance profiles. Bird erythrocytes, on the other hand, demonstrated a half-lysis occurrence at higher osmolality levels compared to mammalian erythrocytes. Nonetheless, bird erythrocytes (*Coturnix japonica domestica*) lysed over a considerably wider osmotic range and contained a subset of cells resilient to hypotonic lysis. These findings indicate that erythrocytes of lower vertebrates possess lower osmotic fragility compared to those of higher vertebrates, a phenomenon likely attributable to embryonic characteristics, ecto-/endothermy, and habitat considerations.

*Keywords:* Osmotic fragility, erythrocytes, laser scattering, comparative analysis