

Вікові особливості трансформації еритроцитів у щурів за умов тривалих і короткочасних холодових впливів

В.В. Ломако, О.В. Шило, Д.Г. Луценко

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків;
e-mail: victoria@regia@gmail.com

Вивчали динаміку трансформації еритроцитів у крові 6, 12 та 24-місячних щурів після тривалих холодових впливів (ТХВ 5°C протягом місяця) і короткочасних (КЧХВ 9 разів при 10°C або -12°C протягом 2 діб). Трансформацію еритроцитів оцінювали за індексом сферичності, який визначали з кривих осмотичної крихкості. Підраховували відсоток переважаючих форм еритроцитів: плоских і нормальних дискоцитів, сфероцитів, стоматоцитів. Після ТХВ у 6-місячних щурів відсоток дискоцитів зменшувався, а сфероцитів збільшувався майже у 5 разів. У 12-місячних тварин збільшувався відсоток плоских високорезистентних дискоцитів, у 24-місячних – обох форм дискоцитів, відсоток змінених форм зменшувався (особливо стоматоцитів). Після КЧХВ (10°C) у 6-місячних щурів зменшувався відсоток нормальних форм дискоцитів, відсоток змінених форм збільшувався (і стомато- і сфероцитів). У 12-місячних збільшувався відсоток обох форм дискоцитів, а частка змінених клітин істотно зменшувалася через стоматоцити; у 24-місячних тварин знижувався відсоток обох змінених форм. Після КЧХВ (-12°C) у 6-місячних щурів відсоток обох форм дискоцитів зменшувався, а змінених форм – збільшувався завдяки сфероцитам. У 12-місячних, як і при ТХВ, збільшувався тільки відсоток плоских дискоцитів, причому майже у 7 разів; у 24-місячних щурів після КЧХВ (-12°C), як і при ТХВ, збільшувався відсоток дискоцитів, а змінених форм зменшувався через стоматоцити. Індекс трансформації підвищувався у 6- і 24-місячних щурів після всіх режимів холодових впливів, причому у старих тварин у декілька разів. У 6-місячних тварин індекс необоротної трансформації різко підвищувався при всіх режимах охолодження, у 12-місячних – мав таку тенденцію після КЧХВ (10°C) і ТХВ, у 24-місячних – не змінювався. У декілька разів зменшувався індекс оборотності у 6- і 24-місячних тварин при всіх режимах охолодження, у 12-місячних він знижувався після КЧХВ (10°C). Таким чином, трансформація еритроцитів залежить від віку щурів і режимів охолодження – із віком гетерогенність популяції еритроцитів у крові зростає (зменшується відсоток дискоцитів і, відповідно, збільшується відсоток необоротно змінених форм). Холодові впливи у 6-місячних щурів призводять до зменшення відсотка дискоцитів і збільшення змінених форм (особливо після обох режимів КЧХВ); у 12-місячних після КЧХВ (10°C) і 24-місячних після ТХВ та КЧХВ (-12°C), навпаки, до збільшення відсотка дискоцитів і зменшення відсотка змінених форм, тобто після холодового навантаження у 12- і, особливо, 24-місячних щурів популяція еритроцитів стає більш однорідною. Ключові слова: еритроцити; «холодова адаптація»; вік; щури.

ВСТУП

Без'ядерні еритроцити є унікальними серед усіх типів клітин і дуже чутливим індикатором стресових і патологічних станів, реагуючи на мінімальні зсуви гомеостазу. Відносно висока однорідність еритроцитів за багатьма параметрами, навіть між різними видами тварин, полегшує реєстрацію всіх

© Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, 2026

змін у клітині. У крові еритроцити представлені гетерогенною за віком і біохімічними параметрами популяцією. Їх висока здатність до трансформації має адаптивне значення і визначає функціональну активність.

Властивість пристосовувати свою форму до умов, що динамічно змінюються, задля мінімізації опору потоку, дає змогу ери-

троцитами проходити через дрібні і звужені кровоносні судини і значною мірою визначає їхнє виживання. Вони налаштовані на забезпечення адекватного кровотоку, але клітини з жорсткою мембраною можуть порушувати перфузію периферичних тканин і безпосередньо блокувати мікросудини. У руслі крові еритроцити циркулюють у формі двовігнутих дисків, що є оптимальним для виконання головної функції – транспорту й постачання тканин організму киснем. Причиною втрати здатності до трансформації може бути зміна форми еритроцита та складу цитозолу, модифікація клітинної мембрани, що може статися внаслідок патологічних змін в організмі або нормального старіння як самих еритроцитів *in vitro* або *in vivo* [1], так і організму в цілому [2].

Дані багатьох досліджень продемонстрували кореляцію між температурою навколишнього середовища та здоров'ям людини; різкі коливання температури докілька навантажують серцево-судинну систему, підвищуючи ризик розвитку захворювань, смертність від яких зростає у зимовий період, особливо у літніх людей [3, 4]. З іншого боку, ретельно підібрані за температурою та часом холодові впливи, навпаки, підвищують стійкість організму до холоду і призводять до розвитку адаптації, формування якої залежить від багатьох факторів, у тому числі й віку [5]. Реакція на вплив холоду розвивається стадійно і практично в усіх системах організму. Функціональне значення фізіологічної холодової адаптації досі не з'ясовано, а деякі відповіді організму можуть бути навіть шкідливими та спричиняти холодові травми [5]. Визначення тонких механізмів, відповідальних за формування адаптації до холоду, в тому числі з урахуванням вікових змін, може покращити здатність людини виживати і працювати в умовах низьких температур. У експерименті найчастіше як моделі холодових навантажень використовують утримання лабораторних тварин у клітках за умов тривалого безперервного або переривчастого (дискретного) впливу низьких температур.

Мета нашої роботи – вивчення динаміки трансформації еритроцитів у щурів різного віку після короткочасних і тривалих холодових впливів.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 6, 12 і 24-місячних самцях білих безпородних щурів масою тіла 272 ± 37 , 382 ± 60 і 448 ± 31 г відповідно, яких до експерименту утримували у віварію Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (ІПКіК НАНУ) на стандартному раціоні.

Експерименти були схвалені комітетом із біоетики ІПКіК НАНУ; (протокол № 2 від 11 березня 2020 р.) і проводили їх відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) і положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Під час вибору температурних режимів, а також для оцінки їхнього впливу на організм ми керувалися розробленим у рамках European COST Action 730 універсальним температурним кліматичним індексом (Universal Thermal Climate Index). Величина температурного стресу визначається за еквівалентною шкалою, яка базується і будується за даними комбінованого впливу факторів навколишнього середовища, а саме температури і вологості повітря, сонячної радіації та швидкості вітру. Використовували низькі позитивні (10°C) та негативні (-12°C) температурні режими. Згідно з універсальним індексом 10°C відповідають нижній межі діапазону температур, в якому відсутній температурний стрес (no thermal stress), а режим -12°C – нижній межі діапазону, для якого характерний температурний стрес середньої величини (moderate thermal stress) [6]. За умов короткочасних холодових впливів (КЧХВ) щурів утримували при 10°C або -12°C у холодівій камері протягом 15 хв кожної години, потім 45 хв

при 22–24°C. Таким чином, КЧХВ проводили 9 разів у світлу частину доби протягом 2 діб. Для моделювання тривалих холодних впливів (ТХВ) тварин утримували у холодному приміщенні в окремих клітках при $5,5 \pm 1,5^\circ\text{C}$ протягом місяця. Сумарний час холодного навантаження становив 5 і 720 год за умов КЧХВ та ТХВ відповідно. Щури були розділені на експериментальні групи ($n = 5$ у кожній). До I контрольної групи ввійшли інтактні тварини; до II і III – тварини після КЧХВ при 10°C і -12°C відповідно, до IV – після ТХВ.

Забір крові, як і фрагментів інших тканин для біохімічних і морфологічних досліджень, проводили після декапітації тварин. Трансформацію еритроцитів оцінювали методом визначення їхнього розподілу у популяції за індексом сферичності (IC), який на підставі теорії осмотичного гемолізу розраховували з кривих осмотичної крихкості (ОК) [7]. Криві ОК отримували за допомогою методу малокутового розсіювання світла на приладі «Кріокон» (Україна), розробленому в ПККіК НАНУ. 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 містить 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 при 20°C . Значення IC відповідали кратності збільшення об'єму еритроцита за умов його трансформації у сфероцит. Переважаючі форми еритроцитів відповідали таким інтервалам IC: (1 – 1,3) сфероцити, (1,3 – 1,7) стоматоцити, (1,7 – 2,1) нормальні та (2,1 – 3) пласкі дискоцити.

За співвідношенням нормальних (дискоцити) та оборотно і необоротно змінених форм еритроцитів розраховували інтегральні показники – індекси трансформації еритроцитів: індекс трансформації – (IT =

ОД+НД)/Д); індекс оборотної трансформації – (IOT = ОД/Д), індекс необоротної трансформації – (IHOT = НД/Д), індекс оборотності – (IO = ОД/НД), де ОД і НД – оборотно і необоротно змінені еритроцити відповідно, Д – дискоцити (у відсотках).

Результати було проаналізовано за допомогою пакета Excel («Microsoft», США) та Social Science Statistics (<https://www.socscistatistics.com/>). Їх розподіл за нормальним законом було перевірено за допомогою тесту Колмогорова-Смірнова. Статистичний аналіз результатів проводили за методом ANOVA, які виражали у вигляді $M \pm SE$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз отриманих результатів показав, що з віком відсоток дискоцитів зменшувався: у 12-місячних щурів – через високорезистентні пласкі, а у 24-місячних – нормальні форми дискоцитів. Відсоток змінених форм еритроцитів, навпаки, зростав внаслідок збільшення необоротно змінених форм сфероцитів (табл. 1). Таким чином, гетерогенність популяції еритроцитів у крові з віком зростала. Детальніший аналіз вікових особливостей трансформації еритроцитів опубліковано нами раніше [8]. Відсоток сплюснених дискоцитів найнижчим був у 12-місячних щурів, частина як оборотно (стоматоцити), так і необоротно (сфероцити) змінених форм із віком збільшувалася і, відповідно, була найбільшою у 24-місячних тварин. Тобто трансформація еритроцитів зі збільшенням віку відбувається за стоматоцитарним шляхом.

Після ТХВ у 6-місячних щурів загальний відсоток дискоцитів і змінених форм не змінювався, але нормальних дискоцитів зменшувався, а сфероцитів майже у 5 разів збільшувався. У 12-місячних тварин збільшувався тільки відсоток пласких дискоцитів, у 24-місячних – обох форм дискоцитів, частка змінених форм зменшувалася через стоматоцити (табл. 1). Після КЧХВ при 10°C у 6-місячних щурів зменшувався відсоток нормальних форм

дискоцитів та збільшувався обох змінених форм. У 12-місячних збільшувався відсоток обох форм дискоцитів, а частка змінених форм істотно зменшувалася через стоматоцити; у 24-місячних тварин зменшувався відсоток обох змінених форм еритроцитів. Після КЧХВ при -12°C у 6-місячних щурів відсоток дискоцитів (і пласких і нормальних) зменшувався, а змінених форм – збільшувався через сфероцити (необоротна форма). У 12-місячних, як і при ТХВ, збільшувався тільки відсоток пласких дискоцитів, причому майже у 7 разів; еритроцити 24-місячних щурів, як і після ТХВ, на вплив відповідали збільшенням відсотка обох форм дискоцитів

та зменшенням змінених форм завдяки стоматоцитам (див. табл. 1).

Таким чином, з віком у щурів зменшується відсоток обох форм дискоцитів. Холодові впливи призводили до зменшення відсотка дискоцитів і збільшення змінених форм у тварин 6-місячного віку (після обох режимів КЧХВ значуще). У 12-місячних тварин (істотно після КЧХВ при 10°C) і 24-місячних (значуще після ТХВ та КЧХВ при -12°C), навпаки, відсоток дискоцитів збільшується. Для аналізу змін поверхневої архітектури еритроцитів розраховували індекси трансформації. Установлено, що всі вивчені індекси у щурів із віком збільшувалися, окрім

Таблиця 1. Розподіл форм еритроцитів за індексом сферичності у щурів різного віку після холодових впливів

| Форми еритроцитів | Умови експерименту | | | |
|-----------------------|--------------------|----------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| | Контроль | Тривалий холододовий вплив | Короткочасний холододовий вплив | |
| | | | 10°C | -12°C |
| 6 міс | | | | |
| Пласкі дискоцити | 4,70±0,70 | 6,90±2,34 | 4,13±0,15 | 3,01±0,20* |
| Нормальні дискоцити | 50,83±1,91 | 43,61±3,25* | 38,55±3,99* | 42,03±2,48* |
| Дискоцити загалом | 55,14±2,45 | 50,50±4,74 | 42,68±4,10* | 45,05±2,48* |
| Стоматоцити | 43,84±2,31 | 42,57±6,12 | 52,01±3,41* | 50,36±4,02 |
| Сфероцити | 1,02±0,29 | 6,92±2,09* | 5,30±0,84* | 5,95±1,81* |
| Змінені форми загалом | 44,85±2,45 | 49,49±4,74 | 57,32±4,10* | 54,94±2,15* |
| 12 міс | | | | |
| Пласкі дискоцити | 1,33±0,09** | 4,09±0,85* | 3,71±1,04* | 8,90±2,90* ** |
| Нормальні дискоцити | 39,43±3,26** | 37,18±7,45 | 48,77±4,30* ** | 35,61±3,45 ** |
| Дискоцити загалом | 40,77±3,31** | 41,27±7,85 | 52,62±5,15* | 37,26±2,65 ** |
| Стоматоцити | 52,87±2,24** | 47,94±9,16 | 33,23±0,91* ** | 55,29±4,10 |
| Сфероцити | 6,37±3,39** | 10,78±3,51 | 14,25±5,25 ** | 4,58±1,87 |
| Змінені форми загалом | 62,57±2,43** | 58,73±7,85 | 40,44±6,25* ** | 62,30±3,08 ** |
| 24 міс | | | | |
| Пласкі дискоцити | 2,57±0,29** | 6,87±1,20* | 9,52±2,04 ** | 4,57±0,32 * ** |
| Нормальні дискоцити | 34,73±4,47** | 49,13±2,93* | 37,64±5,22 | 49,26±1,36* ** |
| Дискоцити загалом | 37,30±4,35** | 56,01±2,75* | 47,14±6,48 | 63,84±1,04* ** |
| Стоматоцити | 55,03±3,10** | 36,0±3,38* | 44,07±4,95* | 39,24±3,21* ** |
| Сфероцити | 7,67±2,42** | 8,00±2,88 | 11,86±2,16* ** | 4,92±2,03 |
| Змінені форми загалом | 62,70±4,35** | 44,00±2,75* | 51,26±6,63 | 43,19±2,13* ** |

Примітка тут і в табл. 2: *P ≤ 0,05 порівняно з контролем відповідного віку; **P ≤ 0,05 порівняно зі значеннями 6-місячних тварин.

ІО (у 12-місячних тварин він знижувався). У 6-місячних щурів ІТ був найнижчим на тлі високих значень ІО (табл. 2).

Кількісна оцінка співвідношення патологічних і нормальних форм еритроцитів за розрахунком ІТ показала, що цей індекс підвищувався у 6- і 24-місячних щурів після всіх режимів холодкових впливів, причому у старих тварин у декілька разів. Це свідчить про зменшення відсотка нормальних форм еритроцитів у крові тварин за цих умов. У 12-місячних щурів ІТ не змінювався. У 6-місячних щурів ІОТ не змінювався, у 12- і 24-місячних – знижувався після КЧХВ (10°C) і ТХВ відповідно. У 6-місячних тварин ІНОТ різко підвищувався за всіх режимів охолодження, у 12-місячних – мав таку тенденцію після КЧХВ (10°C) і ТХВ, а у 24-місячних – не змінювався. У декілька раз зменшувався

ІО у 6- і 24-місячних тварин за всіх режимів охолодження, у 12-місячних – він знижувався після КЧХВ при 10°C (див. табл. 2).

Раніше нами було показано, що після загальної кріостимуляції організму молодих і старих щурів популяція еритроцитів стає більш гетерогенною, оскільки збільшується відсоток як оборотно, так і необоротно змінених форм еритроцитів; значення індексів трансформації еритроцитів знижувалися практично на всіх етапах експерименту [9]. Відомо, що навіть за нормальних умов у крові спостерігається фізіологічний пойкилоцитоз, коли переважаюча більшість клітин представлені нормальними дискоцитами, а решта – оборотно і необоротно зміненими формами. Форму сфероцита набувають еритроцити, що завершують життєвий цикл. Більш осмотично стійкими є еритроцити, що надходять

Таблиця 2. Індеси трансформації еритроцитів у крові щурів різного віку після коротко- і довготривалих холодкових впливів

| Індеси трансформації еритроцитів | Контроль | Тривалий холодковий вплив | Короткочасний холодковий вплив | |
|----------------------------------|-------------|---------------------------|--------------------------------|---------------|
| | | | 10°C | -12°C |
| 6 міс | | | | |
| Індекс трансформації | 0,85±0,09 | 1,07±0,2* | 1,39±0,24* | 1,23±0,11* |
| Індекс оборотної трансформації | 0,94±0,11 | 0,94±0,22 | 1,26±0,21 | 1,14±0,15 |
| Індекс необоротної трансформації | 0,02±0,00 | 0,13±0,04* | 0,13±0,03* | 0,12±0,03* |
| Індекс оборотності | 20,97±7,50 | 5,54±1,94 | 3,96±2,23* | 9,06±2,74* |
| 12 міс | | | | |
| Індекс трансформації | 1,57±0,21** | 1,64±0,59** | 1,33±0,21 | 1,68±0,21 |
| Індекс оборотної трансформації | 1,33±0,11** | 1,37±0,57 | 0,76±0,06* ** | 1,50±0,21 |
| Індекс необоротної трансформації | 0,16±0,08** | 0,27±0,08 | 0,31±0,10** | 0,18±0,04 |
| Індекс оборотності | 8,90±2,90** | 7,62±4,74 | 3,83±0,62* | 11,82±4,40 |
| 24 міс | | | | |
| Індекс трансформації | 1,75±0,29** | 7,99±2,88* ** | 11,86±2,16* ** | 4,92±2,03* ** |
| Індекс оборотної трансформації | 1,53±0,13** | 0,79±0,11* | 1,05±0,27 | 1,50±0,21 |
| Індекс необоротної трансформації | 0,22±0,08** | 0,15±0,05 | 0,31±0,15 | 0,09±0,04 |
| Індекс оборотності | 30,60±7,25 | 10,18±3,17* | 10,24±1,41* ** | 10,52±4,77* |

у кровообіг із кісткового мозку, особливо ретикулоцити і поліхроматофіли, які мають сплюснену дископодібну форму і малий ІС. Мембрана, як найважливіша частка еритроцита, відповідає за підтримку форми, гнучкість і здатність до транспорту кисню, при цьому будь-яке її пошкодження позначається на функції клітини. Форма та цілісність еритроцитарної мембрани залежить від стану цитоскелета і енергетично забезпечується гідролізом АТФ на внутрішній поверхні [10]. Структура і функції еритроцитів багато в чому залежать й від стабільності рН середовища, концентрації Ca^{2+} , активності протеїназних систем. Збільшення концентрації Ca^{2+} у цитоплазмі призводить до зміни форми, зменшення здатності до трансформації і тривалості життя еритроцитів.

Форма еритроцита також змінюється під опосередкованим впливом простагландинів через їхню участь у регуляції кровообігу та запальних процесах [11]. Простагландин Е1 збільшує пластичність еритроцита, а Е2 її зменшує і підвищує ригідність. Під впливом простагландину Е1 в еритроцитах активується синтез цАМФ, що збільшує їхню здатність до деформації, тобто трансформація еритроцитів регулюється, що є одним з основних факторів, які визначають плинність крові. Еритроцити особливо чутливі до оксидативного пошкодження, яке виникає внаслідок дисбалансу між продукцією активних форм кисню (АФК) та здатністю систем антиоксидантного захисту їх нейтралізувати [12]. Внаслідок цього, незважаючи на наявність окисно-відновних систем, критичних для збереження цілісності клітини, регулювання метаболізму, підтримки форми та гнучкості, відбуваються суттєві зміни мембрани та функцій еритроцитів [12–14]. При цьому АФК і метаболіти оксиду азоту здатні пригнічувати або змінювати активність деяких ензимів системи оксидативного захисту, впливаючи на вміст і тип продукції вільних радикалів [15]. Оксидативні процеси сприяють активації перекисного окиснення ліпідів

(ПОЛ), кластеризації протеїну Band 3, розриву цитоскелетних ниток і призводять до полімеризації та агрегації протеїнових структур у матричній мережі, тим самим посилюючи руйнування ультраструктури цитоскелета еритроцитів [1, 16]. Крім того, механічні властивості еритроцитів змінюються під час їхнього старіння. Зниження стабільності мембран еритроцитів при старінні насамперед зумовлено інтенсифікацією вільнорадикальних процесів у плазмі крові за показниками ПОЛ і метаболітів оксиду азоту. Чим можна пояснити збільшення відсотка змінених форм еритроцитів у щурів зі збільшенням віку в нашому дослідженні.

Запалення і оксидативний стрес – основні фактори клітинного старіння, коли клітини припиняють проліферацію і стають дисфункціональними внаслідок виділення молекул запалення, АФК і компонентів позаклітинного матрикса, які так само викликають запалення і старіння в навколишній тканині [17]. Системні захворювання, особливо пов'язані із запаленням, можуть впливати на трансформацію еритроцитів за відсутності гематологічних захворювань [18], а старіння, як відомо, супроводжується активацією запальних процесів в організмі. Окрім залучення у розвиток багатьох патологічних станів і процеси старіння, АФК відіграють ключову роль у контролі запалення, проліферації та апоптозу [19] і є частиною аеробного мітохондріального окисного фосфорилування, яке залежить від рівня метаболізму та споживання кисню. З віком підвищується в'язкість крові, що пов'язано, зокрема зі збільшенням агрегаційної здатності еритроцитів, зниженням їх деформованості, а також заряду. Трансформація еритроцитів при старінні здійснюється за стоматоцитарним шляхом, за кальційзалежним механізмом і визначається зниженням рН та пригніченням Ca^{2+} -помпи, оскільки збільшується рівень H^+ у крові і розвивається метаболічний ацидоз [20]. Закиснення навколишнього середовища викликає агрегацію спектрину в еритроциті і збільшує його

жорсткість. Крім того, на біофізичній моделі показано, що на трансформацію дискоцита у стоматоцит насамперед впливає безрозмірна жорсткість при його згині [21].

Основні чинники і фактори, що впливають на трансформацію еритроцитів у крові, з урахуванням вікових змін, на нашу думку, можуть піддаватися модуляції впливом холоду. За певних умов у відповідь на холод може розвинути адаптація (аклімація), яка залежить від чинника (повітря, вода) та інтенсивності (тривалий постійний або переривчастий) впливу. Крім того, вік, стать, маса тіла, жирові відкладення, тренуваність, дієта та стан здоров'я можуть модифікувати цю відповідь. Спочатку розвивається габітуація (звикання) до відчуття холоду, яка характеризується зменшенням початкового звуження судин шкіри та/або метаболічного теплоутворення, пригніченням реакції артеріального тиску та зменшенням вивільнення катехоламінів, потім розвиваються серцево-судинні, метаболічні та ендокринні реакції організму [22]. За умов охолодження організму, як і при старінні, активуються оксидативні процеси. При ТХВ розвивається подібний до гіпертиреозу стан задля підвищення рівня базального метаболізму, що може призвести до збільшення осмотичної крихкості еритроцитів через активацію ПОЛ, до агрегації еритроцитів і пришвидшення їхнього утворення, але без істотних змін здатності до деформації [23]. Також показано, що регулярні нетривалі контакти з холододим фактором сприяють підвищенню стійкості до холоду завдяки численним адаптивним механізмам [24]. Підвищується здатність еритроцитів до деформації без змін агрегації, що розглядається як захисний механізм, спрямований на полегшення проходження клітин крізь звужені капіляри.

Слід однак зазначити, що хоча внаслідок ТХВ у щурів вже на 21-шу добу настає адаптація термогенезу, цього часу виявляється недостатньо для забезпечення адекватного антиоксидантного захисту [25]. З іншого

боку, періодичні (повторювані) температурні впливи покращують стійкість організму до холоду також завдяки позитивним змінам у системі антиоксидантного захисту: підвищується активність супероксиддисмудази та її співвідношення з каталазою, зменшуються концентрація відновленого та окисненого глутатіону. При цьому активність глутатіонредуктази залежить від маси тіла [26]. Чи пов'язана ця залежність із кількістю жирової тканини або швидкістю охолодження не з'ясовано. Крім того, мітохондріальні АФК виконують функцію сигналу тривоги при зміні позаклітинного середовища: у разі важкого стресу велика їх кількість призводить до пошкодження і загибелі клітин, тоді як мала сприяє адаптації до стресу та виживанню [27].

Під дією холоду також підвищується кількість клітин крові, що відображає безпосередню індукцію кровотворення на рівні кісткового мозку через активацію низки гормональних медіаторів, які регулюють енергетичний обмін та сприяють розвитку холодової адаптації [28].

Таким чином, результати наших досліджень показали, що у відповідь на ТХВ (утримання при 5°C протягом місяця), який вважається природним, зменшується відсоток нормальних дискоцитів і істотно збільшується необоротних сфероцитів у 6-місячних щурів (негативні зміни); збільшується тільки відсоток плоских високорезистентних дискоцитів у 12-місячних тварин (позитивні зміни), збільшується відсоток обох форм дискоцитів та зменшується змінених форм у 24-місячних (тобто популяція еритроцитів стає більш гомогенною, що є найбільш позитивними змінами). Після КЧХВ, які використовуються для прискореної адаптації до холоду, у 6-місячних щурів за обох режимів відбуваються подібні до ТХВ негативні зміни; у 12- і 24-місячних тварин, навпаки, після обох режимів КЧХВ, як і після ТВХ, популяція еритроцитів стає більш гомогенною: відсоток обох форм дискоцитів збільшується, а змінених форм істотно зменшується, тобто адаптивні зміни

формуються вже через 2 доби. Але, можливо, 12- і 24-місячні щури завдяки більшій масі тіла, і відповідному об'єму жирової тканини піддаються менш значному холодовому навантаженню.

ВИСНОВКИ

1. Динаміка трансформації еритроцитів у крові щурів залежить від віку і режимів охолодження, що відрізняються тривалістю та ступенем холодового навантаження. Із віком у крові щурів зменшується відсоток дискоцитів (і плоских і нормальних форм) та збільшується змінених форм (насамперед стоматоцитів).

2. Після всіх режимів охолодження у 6-місячних щурів зменшується відсоток дискоцитів і збільшується змінених форм еритроцитів (сфероцитів) – після ТХВ (майже у 5 разів) та обох режимів КЧХВ, стоматоцитів – після КЧХВ (10°C). При цьому у 12- і 24-місячних тварин, навпаки, після всіх режимів холодового впливу збільшується відсоток і плоских, і нормальних форм дискоцитів, відсоток змінених форм – зменшується.

3. ІТ підвищується у 6- і 24-місячних щурів після всіх режимів холодових впливів, причому у старих тварин у декілька разів. У 6-місячних тварин ІНОТ різко підвищується при всіх режимах охолодження, у 12-місячних – має таку тенденцію після КЧХВ (10°C) і ТХВ, а у 24-місячних – не змінюється. У декілька разів зменшується ІО у 6- і 24-місячних тварин при всіх режимах охолодження, у 12-місячних він знижується після КЧХВ (10°C).

Робота виконана в рамках НДР за темою № 133, шифр 2.2.6.133, № держреєстрації 0121U107846 (2021-2025).

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to

the study, and interrelations of co-authors of the article.

V.V. Lomako, O.V. Shylo, D.G. Lutsenko

AGE-RELATED PECULIARITIES OF ERYTHROCYTE TRANSFORMATION IN RATS UNDER LONG- AND SHORT-TERM COLD EXPOSURES

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine NAS of Ukraine, Kharkiv; e-mail: victoria0regia@gmail.com

We studied the dynamics of erythrocyte transformation in the blood of 6, 12, and 24-month-old rats after long-term cold exposure (LTCE, 5°C for a month) and short-term (STCE, 9 times at 10°C or –12°C for 2 days). Erythrocyte transformation was assessed by the sphericity index, which was determined from osmotic fragility curves. The percentage of predominant erythrocyte forms was calculated: flattened and normal discocytes, spherocytes, and stomatocytes. After LTCE the dynamic of erythrocyte transformation was as follows: 1) in 6-month-old rats, the percentage of discocytes decreased, spherocytes percentage increased almost 5 times; 2) in 12-month-old animals, percentage of flattened highly resistant discocytes rose; 3) in 24-month-old rats, the percentage of both flattened and normal discocytes increased, but percentage of altered forms decreased due to stomatocytes. The STCE (10°C) led to the following changes: 1) in 6-month-old rats, percentage of discocytes waxed due to normal forms, and percentage of altered forms waned due to both stomatocytes and spherocytes; 2) in 12-month-old animals, percentage of discocytes increased due to both normal and flattened, and percentage of altered forms significantly decreased due to stomatocytes; 3) in 24-month-old rats, only percentage of altered forms fell. Under STCE (–12°C), changes were as follows: 1) in 6-month-old rats, the percentage of both flattened and normal discocytes decreased, and the percentage of altered forms increased due to spherocytes; 2) in 12-month-old rats, as after LTCE, only the percentage of flattened discocytes enlarged, almost 7 times; 3) in 24-month-old rats, under STCE (–12°C), as after LTCE, the percentage of discocytes rose, and the percentage of altered forms fell due to stomatocytes. The transformation index increased in 6 and 24-month-old rats after all cold exposure regimens, and in old animals several times. In 6-month-old rats, the irreversible transformation index increased sharply under all cooling modes. The same trend was found in 12-month-old animals both after STCE (10°C) and LTCE. No changes were found in 24-month-old rats. The reversible transformation index decreased several times in 6 and 24-month-old animals after all cold exposure modes, as well as in 12-month-old rats after STCE (10°C). Thus, the transformation of erythrocytes depends on the age of rats and the cooling regimens. With age, the heterogeneity of the erythrocyte population in the blood increases (the percentage of discocytes decreases, and, accordingly, the percentage of irreversibly changed forms increases).

Cold exposure in 6-month-old rats leads to a decrease in the percentage of discocytes and an increase in altered forms (especially after both regimens of STCE); in 12-month-old (after STCE 10°C) and 24-month-old (after LTCE and STCE -12°C) animals. On the contrary, cold application causes an increase in the percentage of discocytes and a decrease in the percentage of changed forms. That is, after cold exposure in 12-month-old rats and especially 24-month-old rats, the erythrocyte population becomes more homogeneous.

Key words: erythrocytes; cold adaptation; age; rats.

REFERENCES

- Barshtein G, Pajic-Lijakovic I, Gural A. Deformability of stored red blood cells. *Front Physiol.* 2021 Sep 22;12:722896. doi: 10.3389/fphys.2021.722896.
- Yadav S, Deepika D, Mautrya PK. A Systematic review of red blood cells biomarkers in human aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2024 Apr 1;79(4):glae004. doi: 10.1093/gerona/glac004.
- Gao Y, Liu Y, He J, Zhang Y, Wang T, Wu L, Sun N, Fang T, Mao H, Tang NJ, Chen X. Effects of heat waves and cold spells on blood parameters: a cohort study of blood donors in Tianjin, China. *Environ Health Prev Med.* 2024; 29:25. doi: 10.1265/ehpm.24-00023.
- Fan JF, Xiao YC, Feng YF, Niu LY, Tan X, Sun JC, Leng YQ, Li WY, Wang WZ, Wang YK. A systematic review and meta-analysis of cold exposure and cardiovascular disease outcomes. *Front Cardiovascul Med.* 2023 Mar 27; 10:1084611. doi: 10.3389/fcvm.2023.1084611.
- Makinen TM. Different types of cold adaptation in humans. *Front Biosci (Schol Ed).* 2010 Jun 1;2(3):1047-67. doi: 10.2741/s117.
- Błażejczyk K, Broede P, Fiala D, Havenith G, Holmér I, Jendritzky G, Kampmann B, Kunert A. Principles of the New Universal Thermal Climate Index (UTCI) and its application to bioclimatic research in european scale. *Miscellanea Geograph.* 2010; 14(1): 91-102. doi: 10.2478/mgrsd-2010-0009.
- Gordiyenko OI, Gordiyenko YE, Makedonska VO. Estimation of erythrocyte population state by the spherical index distribution. *Bioelectrochemistry.* 2004 May; 62(2): 119-22. doi: 10.1016/j.bioelechem.2003.08.004.
- Lomako VV, Shylo OV. Transformation of erythrocytes in rats of different ages. *Adv Gerontol.* 2019; 9(3): 298-302. doi: 10.1134/S2079057019030093.
- Lomako VV, Shylo OV, Kovalenko IF. Transformation of erythrocytes in young and old rats' blood after the whole body cryostimulation. *Fiziol Zh.* 2019; 65(1): 57-65. doi: 10.15407/fz65.01.057.
- Lyu J, Ni M, Weiss MJ, Xu J. Metabolic regulation of erythrocyte development and disorders. *Exp Hematol.* 2024 Mar; 131:104153. doi: 10.1016/j.exp-hem.2024.104153.
- Tymoshchuk OV, Lembryk IS, Kocherga ZR. Prostaglandins - universal biological regulators in the human body (literature review). *Zaporozh Med J.* 2018; 20(1): 121-7. doi: 10.14739/2310-1210.2018.1.122129.
- Obeagu EI, Igwe MC, Obeagu GU. Oxidative stress's impact on red blood cells: Unveiling implications for health and disease. *Medicine (Baltimore).* 2024 Mar 1;103(9):e37360. doi: 10.1097/MD.00000000000037360.
- Massaccesi L, Galliera E, Corsi Romanelli MM. Erythrocytes as markers of oxidative stress related pathologies. *Mech Ageing Dev.* 2020 Oct; 191:111333. doi: 10.1016/j.mad.2020.111333.
- Daraghme DN, Karaman R. The redox process in red blood cells: balancing oxidants and antioxidants. *Antioxidants (Basel).* 2024 Dec 31;14(1):36. doi: 10.3390/antiox14010036.
- Blagojevic DP, Grubor-Lajsic GN, Spasic MB. Cold defence responses: the role of oxidative stress. *Front Biosci (Schol Ed).* 2011 Jan 1;3(2):416-27. doi: 10.2741/s161.
- D'Alessandro A, Anastasiadi AT, Tzounakas VL, Nemkov T, Reisz JA, Kriebardis AG, Zimring JC, Spitalnik SL, Busch MP. Red blood cell metabolism *in vivo* and *in vitro*. *Metabolites.* 2023 Jun 27;13(7):793. doi: 10.3390/metabo13070793.
- Serino A, Salazar G. Protective role of polyphenols against vascular inflammation, aging and cardiovascular disease. *Nutrients.* 2018 Dec 28; 11(1):53. doi: 10.3390/nu11010053.
- Jacob C, Piyasundara L, Bonello M, Nathan M, Kaninia S, Varatharaj A, Roy N, Galea I. Erythrocyte deformability correlates with systemic inflammation. *Blood Cell Mol Dis.* 2024 Nov; 109:102881. doi: 10.1016/j.bcmd.2024.102881.
- de Almeida AJPO, de Oliveira JCPL, da Silva Pontes LV, de Souza Júnior JF, Gonçalves TAF, Dantas SH, de Almeida Feitosa MS, Silva AO, de Medeiros IA. ROS: basic concepts, sources, cellular signaling, and its implications in aging pathways. *Oxid Med Cell Long.* 2022 Oct 19; 2022:1225578. doi: 10.1155/2022/1225578.
- Frassetto L, Sebastian A. Age and systemic acid-base equilibrium: analysis of published data. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 1996; 51(1): B91-9. doi: 10.1093/gerona/51a.1.b91.
- Wen H, Li X, Lu Y, Liu X, Hu G. Stomatocyte-discocyte-echinocyte transformations of erythrocyte modulated by membrane-cytoskeleton mechanical properties. *Biophys J.* 2025 Jan 21; 124(2):267-83. doi: 10.1016/j.bpj.2024.12.001.
- Yurkevicius BR, Alba BK, Seeley AD, Castellani JW. Human cold habituation: Physiology, timeline, and modifiers. *Temperature (Austin).* 2021 May 25;9(2):122-57. doi: 10.1080/23328940.2021.1903145.
- Caglar SE, Karakoc Y, Tanoglu A, Demirtunc R, Tanrikulu S, Kilickaya H, Ercan M. Investigation of hemorheology in patients with hyperthyroidism via blood viscosity, erythrocyte deformability and aggregation. *Thyroid Res.* 2025 Mar 20;18(1):11. doi: 10.1186/s13044-025-00227-w.
- Teległów A, Genç H, Cicha I. Effect of a single immersion in cold water below 4°C on haemorheological properties

- of blood in healthy men. *Sci Rep.* 2024 Apr 12; 14(1):8554. doi: 10.1038/s41598-024-58731-2.
25. Spasić MB, Saicić ZS, Buzadzić B, Korać B, Blagojević D, Petrović VM. Effect of long-term exposure to cold on the antioxidant defense system in the rat. *Free Radic Biol Med.* 1993 Sep;15(3):291-9. doi: 10.1016/0891-5849(93)90076-7.
26. Lubkowska A, Dołęgowska B, Szyguła Z. Whole-body cryostimulation-potential beneficial treatment for improving antioxidant capacity in healthy men-significance of the number of sessions. *PLoS One.* 2012;7(10):e46352. doi: 10.1371/journal.pone.0046352.
27. Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell.* 2012 Oct 26; 48(2):158-67. doi: 10.1016/j.molcel.2012.09.025.
28. Teległów A, Romanovski V, Skowron B, Mucha D, Tota Ł, Rosińczuk J, Mucha D. The effect of extreme cold on complete blood count and biochemical indicators: a case study. *Int J Environ Res Publ Health.* 2021 Dec 31;19(1):424. doi: 10.3390/ijerph19010424.

*Матеріал надійшов
до редакції 21.08.2025*