

Особенности гипертонического криогемолиза и постгипертонического лизиса эритроцитов человека при действии фенобарбитала и барбитала

В.А. БОНДАРЕНКО, Н.В. ПРОКОПЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Peculiarities of Hypertonic Cryohemolysis and Posthypertonic Lysis of Human Erythrocytes under Phenobarbital and Barbital Effect

V.A. BONDARENKO, N.V. PROKOPENKO

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

Калориметрическим методом изучали динамику гипертонического криогемолиза и постгипертонического лизиса эритроцитов человека при внесении в среду инкубации барбитала и фенобарбитала в различных концентрациях. Установлено, что барбитал и фенобарбитал не изменяют уровень постгипертонического лизиса, при котором гемолиз эритроцитов происходит вследствие формирования гемолитической поры в фазе регидратации. При гипертоническом криогемолизе сочетаются осмотический и температурный факторы; на повреждение эритроцитов влияет не только дегидратация, но и ионный транспорт. Барбитал и фенобарбитал снижают уровень гипертонического криогемолиза при уменьшении транспорта ионов через мембрану эритроцитов.

Ключевые слова: эритроцит, барбитал, фенобарбитал, гемолиз, постгипертонический лизис, гипертонический криогемолиз, дегидратация.

Калориметричним методом вивчали динаміку гіпертонічного криогемолізу і постгіпертонічного лізису еритроцитів людини при внесенні у середовище інкубації барбіталу і фенобарбіталу в різних концентраціях. Установлено, що барбітал і фенобарбітал не змінюють рівень постгіпертонічного лізису, при якому гемоліз еритроцитів відбувається внаслідок формування гемолітичної пори у фазі регідратації. При гіпертонічному криогемолізі поєднуються осмотичний і температурний фактори; на ушкодження еритроцитів впливає не тільки дегідратація, але й іонний транспорт. Барбітал і фенобарбітал знижують рівень гіпертонічного криогемолізу при зменшенні транспорту іонів через мембрану еритроцитів.

Ключові слова: еритроцит, барбітал, фенобарбітал, гемоліз, постгіпертонічний лізис, гіпертонічний криогемоліз, дегідратація.

Dynamics of hypertonic cryohemolysis and posthypertonic lysis of human erythrocytes was calorimetrically studied along with the introduction of barbital and phenobarbital in different concentrations into incubation medium. Barbital and phenobarbital were shown not to change the level of posthypertonic lysis when erythrocytes hemolysis occurred as a result of hemolytic pore formation in the rehydration phase. During hypertonic cryohemolysis the osmotic and temperature factors are combined; erythrocytes damage is influenced not only by dehydration, but also by ionic transport. Barbital and phenobarbital decrease the level of hypertonic cryohemolysis along with the decrease of ions transport through erythrocytes membrane.

Key-words: erythrocyte, barbital, phenobarbital, hemolysis, posthypertonic lysis, hypertonic cryohemolysis, dehydration.

Для биологических объектов характерны повреждения при воздействии пониженных температур и повышении осмолярности среды инкубации. Повреждение эритроцитов человека после предварительной инкубации в гипертоническом растворе при постоянной температуре и последующем охлаждении до температуры ниже 13°C, но выше температуры образования кристаллов льда, называется гипертоническим криогемолизом [4]. При инкубации эритроцитов в гипертонической среде и дальнейшем переносе в изотоническую среду наступает постгипертонический лизис [6, 7]. Эти процессы изучают давно, однако до сих пор полностью не объяснены механизмы чувствительности эритроцитов к воздействию неблагоприятных факторов, защиты от повреждений [1]. Установлено, что основную

Damages caused by decreased temperatures and under increasing the incubation medium osmolarity are peculiar for biological objects. Process of human erythrocytes damage after preliminary incubation under hypertonic solution at constant temperature and further cooling down to the one lower than 13°C but higher than ice crystal formation temperature, is called hypertonic cryohemolysis [4]. During erythrocytes incubation in hypertonic medium and further transfer into an isotonic one a posthypertonic lysis occurs [6, 7]. These processes have been studied for a long time, although the mechanisms of erythrocytes' sensitivity to the effect of unfavorable factors, protection against the damages still remain unclear [1]. The major role in maintaining of erythrocytes viability is found to belong to plasmatic membrane. Variation of temperature and incubation medium osmolarity influences physical

Адрес для корреспонденции: Бондаренко В.А., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-01-35, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Bondarenko V.A., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 772 0135, fax: +380 57 772 0084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

роль в поддержании жизнеспособности эритроцитов играет плазматическая мембрана. Изменение температуры и осмолярности среды инкубации влияет на физические характеристики мембраны в целом и различные ее компоненты (конформационные состояния белков, фосфолипидов), в результате нарушаются взаимодействия компонентов мембраны, “цитоскелет-мембрана”, а также изменяется соотношение объем-площадь поверхности [2, 12], значит и биологические функции мембраны, в частности, транспортной и барьерной [1].

Цель работы – изучение особенностей чувствительности эритроцитов к гипертоническому криогемолизу и постгипертоническому лизису при внесении в среду инкубации анестезирующих соединений (барбитала, фенобарбитала).

Материалы и методы

Для исследований использовали консервированную донорскую кровь II группы. Эритроциты получали путем 4-кратного центрифугирования в 0,15 моль/л NaCl (pH 7,4) при 3000 об/мин.

Гипертонический криогемолиз осуществляли в средах инкубации 0,86 моль/л сахарозы, 0,86 моль/л сахарозы + 0,12 моль/л Na₂SO₄, 0,86 моль/л сахарозы + 0,15 моль/л NaCl (pH 7,4). Инкубацию в гипертонической среде проводили 45 мин при 37°C, затем эритроциты переносили на ледяную баню на 5 мин. Уровень свободного гемоглобина определяли калориметрическим методом при длине волны 415 нм и выражали по отношению к 100%-му гемолизу. В среду инкубации до внесения эритроцитов добавляли барбитал и фенобарбитал в концентрациях 0,125-12,5 ммоль/л.

Постгипертонический лизис осуществляли в среде инкубации 3 и 1,5 моль/л NaCl (pH 7,4). Инкубацию в среде 3 моль/л NaCl проводили 10 с с последующим переносом эритроцитов в изотонический раствор (0,15 моль/л NaCl, pH 7,4), а в среде 1,5 моль/л NaCl – 45 мин с последующим переносом эритроцитов в изотоническую среду. В среды инкубации вносили барбитал и фенобарбитал в концентрациях 0,125-12,5 ммоль/л. Уровень гемолиза определяли спектрофотометрически при длине волны 720 нм и выражали в процентах по отношению к гемолизу всех клеток в растворе.

Результаты и обсуждение

После инкубации в гипертонических средах эритроциты приобретали определенную чувствительность к охлаждению. Динамика гипертонического криогемолиза эритроцитов при внесении в среду инкубации различного состава барбитала и фенобарбитала в разных concentra-

characteristics of both the whole membrane and its different components (conformational protein, phospholipid states), as a result there are impaired the membrane components bonds, “cytoskeleton-membrane”, the volume-surface area ratio is also changed [2,12], pointing out to the alterations of membrane biological functions, particularly, of transport and barrier ones [1].

Studying the peculiarities of erythrocytes susceptibility to hypertonic cryohemolysis and posthypertonic lysis while introducing into an incubation medium of anesthetics (barbital, phenobarbital) was the aim of present study.

Materials and methods

Cryopreserved II group donors' blood was used for the investigation. Erythrocytes were obtained by a 4-times' centrifuging in 0.15 mol/l NaCl (pH 7.4) at 3000 rot/min.

Hypertonic cryohemolysis was accomplished in the following incubation media: 0.86 mol/l sucrose, 0.86 mol/l sucrose + 0.12 mol/l Na₂SO₄, 0.86 mol/l sucrose + 0.15 mol/l NaCl (pH 7.4). Incubation in hypertonic medium was performed for 45 min at 37°C followed by erythrocytes transfer on an ice bath for 5 min. Free hemoglobin level was evaluated calorimetrically at 415 nm and expressed in respect of 100% hemolysis. Prior to erythrocytes introduction the incubation medium was added with barbital and phenobarbital in 0.125-12.5 mmol/l concentrations.

Posthypertonic lysis was done in the incubation medium of 3 and 1.5 mol/l NaCl (pH 7.4)/ The incubation in the medium of 3 mol/l NaCl was performed for 10 sec with following erythrocytes' transfer into isotonic solution (0.15 mol/l NaCl, pH 7.4) and in the medium of 1.5 mol/l NaCl within 45 min with further erythrocytes' transfer into isotonic medium. Barbital and phenobarbital in 0.125-12.5 mmol/l concentrations were introduced into the incubation media. Hemolysis level was spectrophotometrically determined at 720 nm wavelength and manifested in percent in respect of total hemolysis.

Results and discussion

Following the incubation in hypertonic media the erythrocytes were noted to get accertain cooling-sensitive. Dynamics of erythrocytes hypertonic cryohemolysis while introducing barbital and phenobarbital of different concentrations into the incubation medium of different composition is shown in Fig. 1. Analysis of the data demonstrated the degree of hypertonic cryohemolysis to be dependent both upon the incubation medium composition and type of anaesthetics introduced. When increasing barbital and phenobarbital concentrations hemolysis level was shown to decrease. In the absence of mentioned compounds

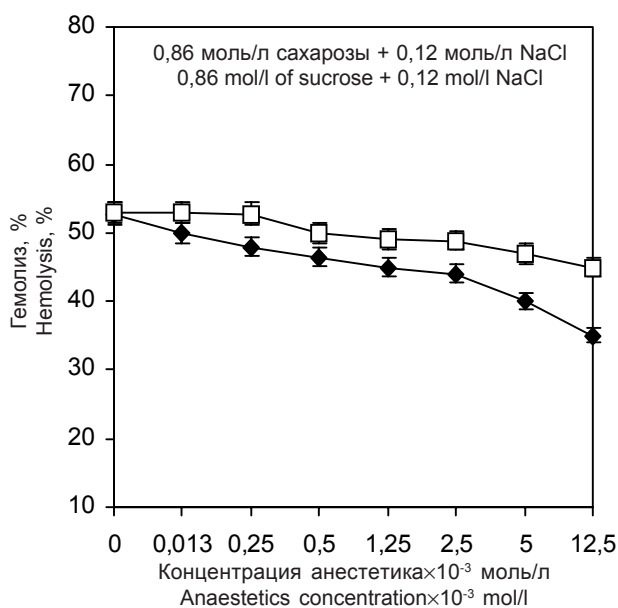
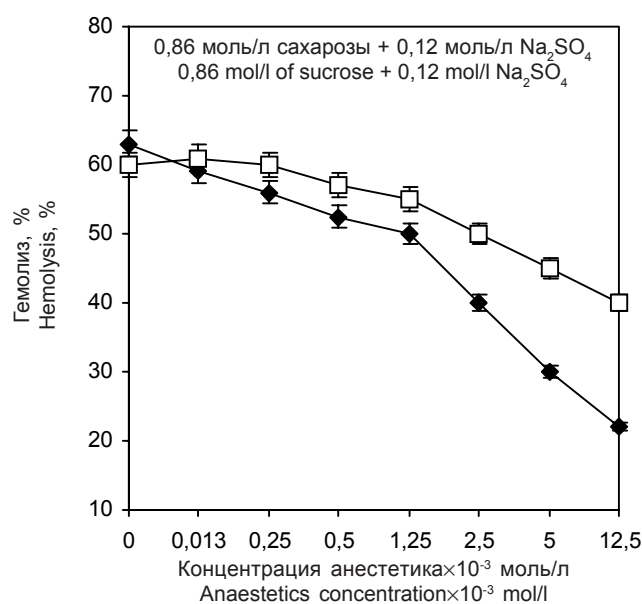
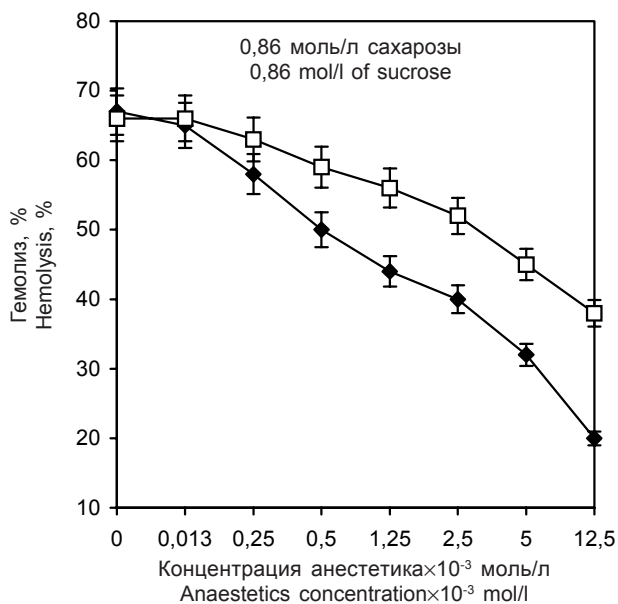


Рис. 1. Динамика гипертонического криогемолиза в присутствии: □ – барбитала; ◆ – фенобарбитала.
Fig.1. Dynamics of hypertonic cryohemolysis in the presence of: □ – barbital; ◆ – phenobarbital.

циях представлена на рис. 1. Анализ данных показал, что степень гипертонического криогемолиза зависит от состава среды инкубации и вида вносимого анестезирующего соединения. При увеличении концентрации барбитала и фенобарбитала уровень гемолиза снижается. Без указанных соединений в среде инкубации максимальный уровень гемолиза наблюдается в средах, содержащих 0,86 моль/л сахарозы, 0,86 моль/л сахарозы + 0,12 моль/л Na₂SO₄, минимальный – в среде 0,86 моль/л сахарозы + 0,15 моль/л NaCl.

Наибольшее влияние на уровень гипертонического криогемолиза оказывает фенобарбитал (рис. 1). В концентрации 12,5 ммоль/л он снижает степень гемолиза в 3 раза по сравнению с контрольным значением во всех средах измерения. Барбитал в аналогичной концентрации понижает степень гемолиза в 1,1-1,7 раза.

in the incubation medium the maximum hemolysis level was observed in those media containing 0.86 mol/l sucrose, 0.86 mol/l sucrose + 0.12 mol/l Na₂SO₄, while the minimum one was in the medium with 0.86 mol/l sucrose + 0.15 mol/l NaCl.

The most significant effect towards the level of hypertonic cryohemolysis was demonstrated by phenobarbital (Fig.1). In the concentration of 12.3 mmol/l it decreases hemolysis level by 3 times comparing to the control value in all the media. Barbital in the same concentration was shown to reduce the hemolysis degree by 1.1-1.7 times.

According to the published data [1, 4] hypertonic cryohemolysis has two steps: erythrocytes incubation in hypertonic medium at the temperature of 20-50°C and cooling down to 13°C. Hypertonic incubation medium may contain both sucrose and NaCl. Incubation medium composition stipulates some peculiarities of the level of hypertonic cryohemolysis, while the fact that temperature fall causes the erythrocytes' hemolysis is the general regularity.

Effects of barbital and phenobarbital could be used to find out whether they would affect hemolysis level under the influence of solely hypertonic incubation medium.

Barbital and phenobarbital introduction into hypertonic incubation medium did not affect the level of erythrocytes' posthypertonic lysis, which made 83-85% (Fig. 2).

When placing erythrocytes into a hypertonic medium containing both electrolytes and non-electrolytes a cell dehydration occurs [2, 7]. As a result

Согласно данным [1, 4], гипертонический криогемолиз условно состоит из двух стадий: инкубации эритроцитов в гипертонической среде при температуре 20-50°C и охлаждения ниже 13°C. Гипертоническая среда инкубации может содержать как сахарозу, так и NaCl. Состав среды инкубации обуславливает некоторые особенности уровня гипертонического криогемолиза, однако общей закономерностью является то, что понижение температуры вызывает гемолиз эритроцитов.

По влиянию барбитала и фенобарбитала на уровень гипертонического криогемолиза можно определить, будут ли они влиять на степень гемолиза под воздействием только гипертонической среды инкубации.

Внесение барбитала и фенобарбитала в гипертоническую среду инкубации не влияет на уровень постгипертонического лизиса эритроцитов, который составляет 83-85% (рис. 2).

При помещении эритроцитов в гипертоническую среду, содержащую как электролиты, так и неэлектролиты, происходит обезвоживание клеток [2, 7]. В результате эритроциты превращаются в уплощенные гладкие диски [1, 15], концентрируется цитоплазматическое содержимое [6, 7], а также изменяется ионный гомеостаз. Трансформация формы эритроцитов и концентрирование цитоплазмы вызывают изменение во взаимодействии белков цитоскелета, частичную диссоциацию белка полосы 4.1 и мембраны [10]. Следовательно, происходит открепление цитоскелета от мембраны, а также частичная олигомеризация спектрина [14]. Открепление цитоскелета от мембраны эритроцита приводит к сжатию сети цитоскелета [2]. При нарушении стабильности мембраны и последующей регидратации может сформироваться гемолитическая пора, в результате эритроциты подвергаются лизису [16]. При этом в общей популяции эритроцитов существуют устойчивые к постгипертоническому лизису клетки и неустойчивые.

Отсутствие влияния барбитала и фенобарбитала на уровень постгипертонического лизиса позволяет предположить, что они не оказывают существенного влияния на взаимодействие белков цитоскелета и плазматической мембраны. Вероятно, взаимодействия барбитала, фенобарбитала и аннулярных липидов белка полосы 3 [13] не изменяют связи белок полосы 3-анкирин-спектрин.

В ходе инкубации при гипертоническом криогемолизе сжатие эритроцитов в гипертоническом растворе происходит прежде чем начнется понижение температуры среды инкубации. В фазе обезвоживания клеток имеют место такие же процессы, как и при обезвоживании в ходе постгипертонического лизиса, однако понижение

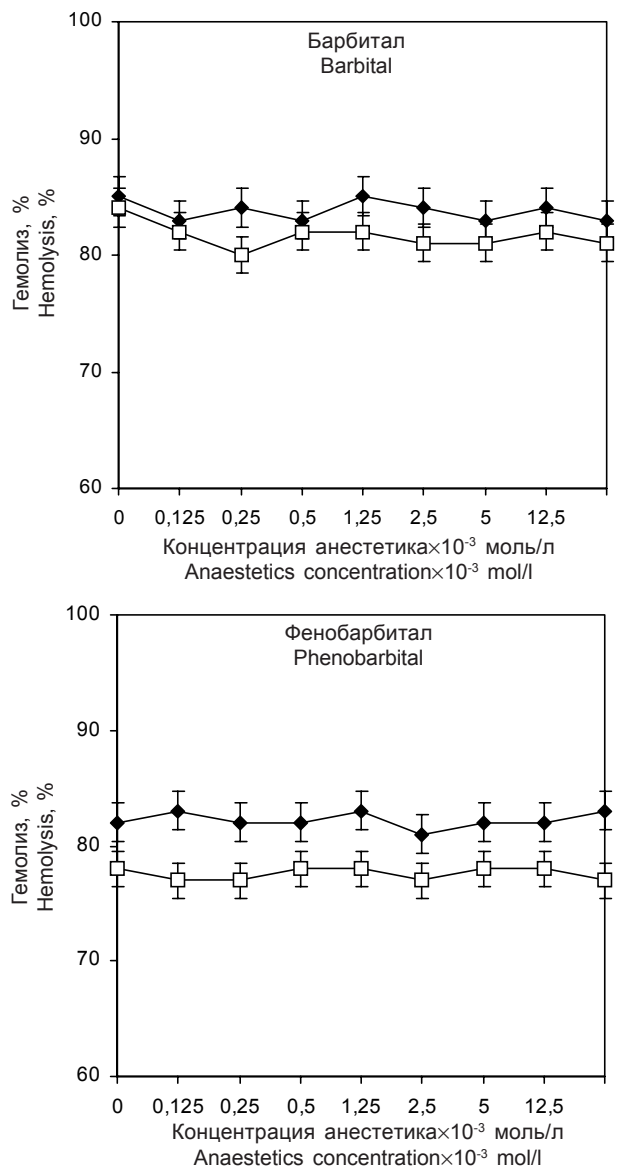


Рис. 2. Динамика постгипертонического лизиса в растворах с концентрацией NaCl: □ – 3 моль/л; ◆ – 1,5 моль/л.

Fig. 2. Dynamics of hypertonic cryohemolysis in solutions with NaCl concentration of: □ – 3 mol/l; ◆ – 1.5 mol/l.

erythrocytes are transformed into flattened smooth discs [1, 15], cytoplasmatic content is concentrated [6, 7], as well as ionic homeostasis is changed. Erythrocytes shape transformation and cytoplasm concentrating were noted to cause the change in a cytoskeleton proteins' interaction, partial dissociation of band 4.1 protein and membrane [10]. Consequently the cytoskeleton disconnection from the membrane, as well as spectrin partial oligomerization occur [14]. Cytoskeleton disconnection from erythrocyte's membrane results in a cytoskeleton net reticulum shrinkage [2]. When membrane stability is impaired and during further re-hydration a hemolytic pore may be formed, as a result the erythrocytes are subjected to lysis [16], although in the total erythrocytes population

температуры приводит к сохранению сжатого состояния цитоскелета, олигомерного состояния спектрина и снижению скорости репарации мембранных дефектов [1, 2].

Следует отметить, что механизмы развития повреждений при инкубации в гипертонических растворах сахарозы и растворах NaCl различны.

Кроме изменений взаимодействия белков цитоскелета и мембраны эритроцитов, инкубация в сахарозной среде сопровождается выходом ионов K^+ и Cl^- из клеток. По мере выхода Cl^- выходит ион K^+ и диффундирует внутриклеточная вода [8].

Интенсивность выхода ионов зависит от состава среды инкубации (концентрации в ней анионов Cl^-), ее осмолярности, ионной силы, pH и температуры, а также действия ингибиторов анионного транспорта [9, 11, 16].

Таким образом, отсутствие анионов Cl^- в среде инкубации вызывает их максимальный выход из эритроцитов, и, следовательно, максимальный уровень гипертонического криогемолиза.

Анестезирующие соединения ингибируют транспорт анионов, осуществляемый с помощью белка полосы 3 [3]. Ингибирование транспорта анионов, как и изменение уровня гипертонического криогемолиза, зависит от концентрации барбитала и фенобарбитала в среде инкубации и, возможно, при сходных концентрациях. Отсутствие влияния этих соединений на уровень постгипертонического лизиса позволяет предположить, что изменение активности транспорта ионов не является основным фактором при формировании определенного уровня гипертонического криогемолиза.

Ингибирование транспортных процессов препятствует утечке ионов Cl^- и K^+ , а также связанной с ними воды. Это тормозит развитие процессов, связанных с уменьшением объема эритроцитов и концентрированием внутреннего содержимого.

Кроме того, блокирование транспорта препятствует повышению внутриклеточного pH [9]. Нормализация уровня pH эритроцитов способствует сохранению взаимодействий белков мембраны и цитоскелета, белков цитоскелета, а также нормальному функционированию ферментов эритроцитов [10].

Выводы

Барбитал и фенобарбитал не изменяют уровень постгипертонического лизиса эритроцитов. Эти соединения не могут значительно модифицировать взаимодействие белков цитоскелета и цитоскелет-мембранного комплекса.

Введение барбитала и фенобарбитала снижает уровень гипертонического криогемолиза. Степень снижения уровня гемолиза повышается с увеличением их концентрации в среде инкубации.

there are the cells both stable and unstable to posthypertonic lysis.

Absence of barbital and phenobarbital effects on the level of posthypertonic lysis enables to suppose that they have no significant influence on cytoskeleton proteins interaction with plasmatic membrane. It appears that the interactions of barbital, phenobarbital and annular band 3 protein lipids [13] do not change band 3 protein-ankyrin-spectrin bonds.

During the incubation at hypertonic cryohemolysis an initial erythrocyte shrinkage occurs in hypertonic solution as well as further temperature decrease of the incubation medium. In cell dehydration phase the same processes as at dehydration during posthypertonic lysis occur, although the temperature decrease results in maintenance of a shrunken cytoskeleton state, oligomere spectrin state and reparation rate reduction of membrane defects [1, 2].

It should be noted that the mechanisms of damage development during incubation are different in hypertonic sucrose and NaCl solutions.

Along with the changes of cytoskeleton proteins with erythrocytes membrane, incubation in sucrose medium is accompanied by outflux of K^+ and Cl^- ions out of cells. While Cl^- leaving K^+ is releasing and intracellular water diffuses [8].

Intensity of ions outflux depends upon the incubation medium composition (concentration of Cl^- anions in it), osmolarity, ionic strength, pH and temperature, as well as of the effect of anion transport inhibitors [9, 11, 16].

Thus at the absence of Cl^- anions in the incubation medium its flow out of erythrocytes is found to be the highest, and the level of hypertonic cryohemolysis is the maximum therefore.

Anesthetic compounds inhibit the anion transport performed with band 3 protein [3]. Both anion transport inhibiting and change of the level of hypertonic cryohemolysis depend on the concentration of barbital and phenobarbital in the incubation medium and possibly at similar concentrations. The absence of these compounds effect on the level of posthypertonic lysis enables to assume, that a change in ion transport activity is not the main factor in the formation of certain level of hypertonic cryohemolysis.

Transport processes inhibition prevents the outflux of Cl^- and K^+ ions and also of bound water. This inhibits the processes related to erythrocytes volume reduction and content concentrating.

Also, the transport blocking prevents the rise of intracellular pH [9]. Normalization of erythrocytes' pH level promotes the retaining of membrane and cytoskeleton proteins, cytoskeleton proteins, as well as normal functioning of erythrocytes enzymes [10].

Conclusions

Barbital and phenobarbital were found not to change the level of posthypertonic erythrocytes lysis.

Вследствие ингибирования транспорта ионов, контролируемого белком полосы 3, снижается уровень криогемолиза.

Литература

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бабийчук Л. А. и др. Единый механизм повреждения клетки при термальном шоке, замораживании и постгипертоническом лизисе // Криобиология.– 1985.– №3.– С. 25-32.
2. Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П., Руденко С. В. Эффекты дегидратации в контроле холодовой и осмотической чувствительности клеток // Пробл. криобиологии.– 1992.– №4.– С. 14-25.
3. Бондаренко Н. В., Рамазанов В. В., Бондаренко В. А. Вплив барбітуратів на обмін хлориду і сульфату в еритроцитах крові людини // Вісник проблем біології і медицини. – 2002.– Вип. 9-10.– С. 3-7.
4. Гордиенко Е. А., Коваленко С. Е. Биофизическая модель явления гипертонического криогемолиза // Пробл. криобиологии.– 1996.– №4.– С. 24-32.
5. Carpenter J.F., Crowe J.H. The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes // Cryobiology.– 1988. – Vol. 25.– N3.– P. 244-255.
6. Farrant J., Woolgar A.E. Human red cells under hypertonic conditions: a model system for investigating freezing damage 1. Sodium chloride // Cryobiology.– 1972.– Vol. 9.– P. 9-15.
7. Farrant J., Woolgar A. E. Human red cells under hypertonic conditions: a model system for investigating freezing damage 2. Sucrose // Cryobiology.– 1972.– Vol. 9.– P. 16-21.
8. Glaser R., Donath J. Stationary ionic states in human red blood cells// Bioelectrochem. Bioenerg.– 1984.– Vol.13.– P. 71-83.
9. Green F.A., Jung C.Y. Cold-Induced hemolysis in a hypertonic milieu // J. Membrane. Biol.– 1977.– Vol.33.– P. 249-262.
10. Haest C.W.M. Interactions between membrane skeleton proteins and the intrinsic domain of the erythrocyte membrane // Biochim. Biophys. Acta.– 1982.– Vol. 694.– P. 331-352.
11. Jung C.Y., Green F.A. Hypertonic cryohemolysis: Ionophore and pH effects // J. Membrane Biol.– 1978.– Vol. 39.– P. 273-284.
12. Lange J., Hadesman R.A., Steck T.L. Role of the reticulum in the stability and shape of the isolated human erythrocyte membrane // J. Cell Biol.– 1982.– Vol. 92.– P. 714-721.
13. Lee A.G. Interaction between phospholipids and barbiturates // Biochim. Biophys.Acta.– 1976.– Vol.455.– P. 102-110.
14. Liu S., Windisck P., Kim S., Palek J. Oligomeric state of spectrin in normal erythrocyte membranes: biochemical and electron microscopic studies // Cell.– 1984.– Vol. 37.– P. 587-594.
15. Williams R. J., Takahashi T. Erythrocyte metastability: Microscopic observation of thermal shock hemolysis // Cryo-Letters.– 1984.– Vol. 5.– N2.– P. 111-116.
16. Woolgar A.E., Morris C.J. Some combined effects of hypertonic solutions and changes in temperature on post-hypertonic haemolysis of human red blood cells // Cryobiology.– 1973.– Vol. 10.– P. 82-86.

Поступила 25.08.2004

These compounds are incapable of significantly modifying the interaction of cytoskeleton proteins and that of cytoskeleton-membrane complex.

Introduction of barbital and phenobarbital reduced the level of posthypertonic cryohemolysis. The reduction rate of hemolysis level is increasing along with the compounds concentration rise in the incubation medium. As a result of ion transport inhibition controlled by band 3 protein, level of cryohemolysis was shown to decrease.

References

1. Belous A.M., Bondarenko V.A., Babijchuk L.A. et al. Entire mechanism for cell damage at temperature shock, freezing and posthypertonic lysis// Kriobiologiya.– 1985.– N3.– P. 25-32.
2. Bondarenko V.A., Bondarenko T.P., Rudenko S.V. Dehydration effects in controlling cold and osmotic cell sensitivity // Problems of Cryobiology.– 1992.– N4.– P. 14-25.
3. Bondarenko N.V., Ramazanov V.V., Bondarenko V.A. Barbiturates effect on chloride and sulfate metabolism in human blood erythrocytes // Visnyk problem biologii i meditsyny.– 2002.– Issue 9-10.– P. 3-7.
4. Gordienko E.A., Kovalenko S.E. Biophysical model of the phenomenon of hypertonic cryohemolysis // Problems of Cryobiology.– 1996.– N4.– P. 24-32.
5. Carpenter J.F., Crowe J.H. The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes // Cryobiology.– 1988. – Vol. 25.– N3.– P. 244-255.
6. Farrant J., Woolgar A.E. Human red cells under hypertonic conditions: a model system for investigating freezing damage 1. Sodium chloride // Cryobiology.– 1972.– Vol. 9.– P. 9-15.
7. Farrant J., Woolgar A. E. Human red cells under hypertonic conditions: a model system for investigating freezing damage 2. Sucrose // Cryobiology.– 1972.– Vol. 9.– P. 16-21.
8. Glaser R., Donath J. Stationary ionic states in human red blood cells// Bioelectrochem. Bioenerg.– 1984.– Vol.13.– P. 71-83.
9. Green F.A., Jung C.Y. Cold-Induced hemolysis in a hypertonic milieu // J. Membrane. Biol.– 1977.– Vol.33.– P. 249-262.
10. Haest C.W.M. Interactions between membrane skeleton proteins and the intrinsic domain of the erythrocyte membrane // Biochim. Biophys. Acta.– 1982.– Vol. 694.– P. 331-352.
11. Jung C.Y., Green F.A. Hypertonic cryohemolysis: Ionophore and pH effects // J. Membrane Biol.– 1978.– Vol. 39.– P. 273-284.
12. Lange J., Hadesman R.A., Steck T.L. Role of the reticulum in the stability and shape of the isolated human erythrocyte membrane // J. Cell Biol.– 1982.– Vol. 92.– P. 714-721.
13. Lee A.G. Interaction between phospholipids and barbiturates // Biochim. Biophys.Acta.– 1976.– Vol.455.– P. 102-110.
14. Liu S., Windisck P., Kim S., Palek J. Oligomeric state of spectrin in normal erythrocyte membranes: biochemical and electron microscopic studies // Cell.– 1984.– Vol. 37.– P. 587-594.
15. Williams R. J., Takahashi T. Erythrocyte metastability: Microscopic observation of thermal shock hemolysis // Cryo-Letters.– 1984.– Vol. 5.– N2.– P. 111-116.
16. Woolgar A.E., Morris C.J. Some combined effects of hypertonic solutions and changes in temperature on post-hypertonic haemolysis of human red blood cells // Cryobiology.– 1973.– Vol. 10.– P. 82-86.

Accepted in 25.08.2004