

УДК 57.043:577.352.4:611.018.51

Е.А. Семионова, Н.А. Ершова, С.С. Ершов, Н.В. Орлова, Н.М. Шпакова*

Особенности проявления постгипертонического лизиса эритроцитов некоторых млекопитающих

UDC 57.043:577.352.4:611.018.51

E.A. Semionova, N.A. Yershova, S.S. Yerшов, N.V. Orlova, N.M. Shpakova*

Peculiarities of Posthypertonic Lysis in Erythrocytes of Several Mammals

Реферат: Исследована чувствительность эритроцитов некоторых видов млекопитающих (человек, крыса, кролик) к действию постгипертонического лизиса при варьировании концентрации NaCl в среде дегидратации, продолжительности инкубирования клеток и температуры. Показана определяющая роль этапа дегидратации (по сравнению с этапом регидратации) для развития постгипертонического лизиса эритроцитов млекопитающих, поскольку концентрация соли в гипертонической среде и продолжительность инкубирования в ней определяют уровень гемолиза клеток. На этапе дегидратации выявлена потеря катионов калия клетками человека и кролика, что зависит от концентрации соли в среде. Установлено, что уровень постгипертонического лизиса эритроцитов человека, крысы и кролика определяется температурными условиями эксперимента. При 0°C значения постгипертонического лизиса эритроцитов млекопитающих ниже, чем при 37°C, причем эта особенность лучше выражена для клеток животных. Результаты сравнительного анализа реакции клеток на действие постгипертонического лизиса показали, что максимальной устойчивостью обладают эритроциты кролика, а минимальной – клетки крысы.

Ключевые слова: эритроциты, человек, крыса, кролик, постгипертонический лизис, дегидратация, регидратация, температура, концентрация NaCl.

Реферат: Досліджено чутливість еритроцитів деяких видів ссавців (людина, щур, кролик) до дії постгіпертонічного лізису під час варіювання концентрації NaCl у середовищі дегідратації, тривалості інкубування клітин і температури. Показана визначальна роль етапу дегідратації (в порівнянні з етапом регідратації) для розвитку постгіпертонічного лізису еритроцитів ссавців, оскільки концентрація солі в гіпертонічному середовищі та тривалість інкубування в ньому визначають рівень гемолізу клітин. На етапі дегідратації виявлена втрата катіонів калію клітинами людини та кролика, що залежить від концентрації солі в середовищі. Встановлено, що рівень постгіпертонічного лізису еритроцитів людини, щура і кролика визначається температурними умовами експерименту. При 0°C значення постгіпертонічного лізису еритроцитів ссавців нижче, ніж при 37°C, причому ця особливість краще виражена для клітин тварин. Результати порівняльного аналізу реакції клітин на дію постгіпертонічного лізису показали, що максимальну стійкість проявляють еритроцити кролика, а мінімальну – клітини щура.

Ключові слова: еритроцити, людина, щур, кролик, постгіпертонічний лізис, дегідратація, регідратація, температура, концентрація NaCl.

Abstract: The erythrocyte sensitivity of some mammalian species (human, rat, rabbit) to posthypertonic lysis effect when varying NaCl concentration in dehydration medium, cell incubation duration and temperature was studied. We demonstrated here a determining role of dehydration stage (compared to rehydration one) for posthypertonic lysis development in mammalian erythrocytes, since the salt concentration in hypertonic medium and incubation duration in it determined the level of cell hemolysis. The loss of potassium cations by human and rabbit cells, depending on salt concentration in the medium was revealed at dehydration stage. The level of posthypertonic lysis in human, rat and rabbit erythrocytes was established as determined by experimental temperature conditions. Values of posthypertonic lysis of mammalian erythrocytes are lower at 0°C, than at 37°C, and this feature is much pronounced for animal cells. The results of comparative analysis of cell response to posthypertonic lysis effect showed rabbit erythrocytes to have the maximum resistance, and the minimum one was in rat cells.

Key words: erythrocytes, human, rat, rabbit, posthypertonic lysis, dehydration, rehydration, temperature, NaCl concentration.

Вымораживание свободной воды при криоконсервировании биологического материала приводит к концентрированию внеклеточного раствора, и наоборот – при размораживании происходит снижение значений осмолярности среды. Кроме того, на этапах удаления проникающего криопротектора из суспензии после замораживания-

Free water freezing-out during biological material cryopreservation results in the extracellular solution concentrating, and *vice versa* during thawing the values of medium osmolality decrease. In addition, the removal of penetrating cryoprotectant from the suspension after freeze-thawing results in a contact of cells with the solutions, which osmolality is lower than

Отдел криофизиологии клетки, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

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

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61016; тел.: (+380 57) 373-41-35, факс: (+380 57) 373-30-84, электронная почта: starling_nataly@mail.ru

*To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61016; tel.: +380 57 373 4135, fax: +380 57 373 3084, e-mail: starling_nataly@mail.ru

Поступила 29.09.2015
Принята в печать 27.01.2016

Received September, 29, 2015
Accepted January, 27, 2016

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, №1. – С. 73–83.
© 2016 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Probl Cryobiol Cryomed 2016; 26(1): 73–83.
© 2016 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

отогрева клетки начинают контактировать с растворами, осмоляльность которых ниже внутриклеточной. Таким образом, постгипертонический лизис можно рассматривать в качестве одного из основных факторов повреждения клеток на конечном этапе их криоконсервирования [1].

Для изучения постгипертонического лизиса клеток на этапе отогрева используют разные модельные подходы. Один из них заключается в переносе эритроцитов в изотонический раствор из гипертонических сред (модель постгипертонического лизиса, ПГЛ) [1, 6]; другой – из изотонических условий в гипотонические растворы (гипотонический лизис) [9] при положительных температурах. Общим результатом применения этих модельных подходов является увеличение объема клеток [1, 4]. В основе ПГЛ клеток лежат два процесса: дегидратация при инкубировании в гипертонической среде и последующая регидратация, которая развивается при переносе клеток в изотонические условия, однако для гипотонического лизиса характерен только один процесс, связанный с набуханием клеток при их переносе в гипотонические условия. Поэтому для моделирования действия на клетки факторов криоповреждения в условиях отогрева клеточной суспензии лучше использовать ПГЛ.

Понятие «стресс» было введено Г. Селье и рассматривалось как ответные реакции на любое сильное неблагоприятное (стрессовое) воздействие у животных и человека [8]. Позже этот термин стали широко применять при изучении действия различных стрессовых факторов на клетки. Следует отметить, что в криобиологической литературе термин «постгипертонический лизис» часто используют как для обозначения собственно стрессового фактора, так и описания реакции клеток на его действие.

Многочисленные работы [1, 3, 5, 9, 17] посвящены изучению реакции эритроцитов человека на изменение осмотических и температурных условий среды. В частности, было показано, что ПГЛ эритроцитов человека зависит от качественного состава сред дегидратации и регидратации; концентрации растворенных веществ и продолжительности инкубирования на этапе дегидратации клеток, а также температуры. С.В. Пателарос и О.П. Синчикова [7] изучали влияние состава сред дегидратации и регидратации на уровень ПГЛ эритроцитов человека. В том случае, когда на этапах дегидратации и регидратации ПГЛ применяли электролитные или неэлектролитные среды, уровень гемолитического повреждения эритроцитов в первом случае был ниже. Уровень ПГЛ эритроцитов определяется составом среды регидратации. Так, после инкуби-

intracellular one. So, we may consider a posthypertonic lysis to be one of the main factors of cell damage at the final stage of their cryopreservation [1].

Different simulations are used to study a posthypertonic lysis of cells at thawing stage. One of them consists in transferring the erythrocytes into isotonic solution from hypertonic media (model posthypertonic lysis, PHL) [1, 14]; the other one is based on the cell transfer from isotonic conditions into hypotonic solutions (hypotonic lysis) [19] at positive temperatures. The general result of applying these model approaches is an increase of cell volume [1, 9]. The PHL of cells involves two processes: dehydration during incubation in hypertonic medium and subsequent rehydration, developing during cell transfer under isotonic conditions, while hypotonic lysis is characterized by only one process, associated with cell swelling during their transfer under hypotonic conditions. Therefore, it is preferable to use PHL to model the effect of cryo-damage factors on cells when thawing cell suspension.

The term 'stress' was introduced by H. Selye and considered as the responses to any severe unfavourable (stressful) influence in animals and human [18]. Later this term became widely used in studying the effect of different stress factors on cells. It should be noted that in cryobiological publications the term 'posthypertonic lysis' is often used both to specify the stress factor *per se* and to describe a cell response to its effect.

Numerous researches [1, 4, 6, 13, 19] are devoted to the investigations of human erythrocyte response to the change in osmotic and temperature conditions of the medium. It was shown in particular that PHL in human erythrocytes depended on qualitative composition of dehydration and rehydration media; solutes concentration and duration of incubation at the stage of cell dehydration, and temperature as well. S.V. Patelaros and O.P. Synchykova [15] have studied the effect of dehydration and rehydration media composition on the PHL level in human erythrocytes. In case when at the PHL dehydration and rehydration stages either electrolyte or non-electrolyte media were applied, the level of hemolytic damage in erythrocytes in first case was lower. The erythrocyte PHL level was determined by the rehydration medium composition. For example, after incubating the cells in the medium containing 1.5 mol/l NaCl, the observed PHL level in erythrocytes was lower if the cells were transferred into a sucrose medium (0.27 mol/l), if compared with a saline one (0.15 mol/l NaCl). PHL development in human erythrocytes depends on the osmolality of hypertonic medium and duration of cell incubation in it [15]. The short-term dehydration of erythrocytes causes no severe disorders in their membranes during following cell rehydration, however, more prolonged



рования клеток в среде, содержащей 1,5 моль/л NaCl, регистрируемый уровень ПГЛ эритроцитов при перенесении клеток в сахарозную среду (0,27 моль/л) был ниже, чем в солевую (0,15 моль/л NaCl). Для развития ПГЛ эритроцитов человека важным являются осмоляльность гипертонической среды и продолжительность инкубирования в ней клеток [7]. Процесс кратковременной дегидратации эритроцитов не вызывает серьезных нарушений их мембран при последующей регидратации клеток, однако увеличение продолжительности инкубирования в гипертонических условиях сопровождается ростом ПГЛ [7].

Для выяснения механизмов устойчивости эритроцитов человека к действию стрессовых факторов широко используется подход, связанный с направленной модификацией различных структурных и функциональных компонентов клетки. Эти изменения не являются узкоспецифичными и могут охватывать клетку в целом. В связи с этим для исследования ПГЛ клеток целесообразно использовать нативные (немодифицированные) эритроциты разных видов млекопитающих, которые отличаются по составу цитоплазмы, способности к деформации, активности транспортных путей, фосфолипидному и белковому составу мембраны [10–12, 15, 16]. Кроме того, в отличие от ПГЛ эритроцитов человека особенности развития ПГЛ клеток животных остаются неизученными.

Цель работы – сравнительное изучение особенностей проявления постгипертонического лизиса эритроцитов человека, крысы, кролика при варьировании концентрации NaCl в среде дегидратации, продолжительности инкубирования клеток и температуры.

Материалы и методы

Для исследования использовали эритроциты, полученные из донорской крови человека (*Homo sapiens*), кролика (*Oryctolagus cuniculus*) и крысы (*Rattus norvegicus*), заготовленной на гемоконсерванте «Глюгидир» («Биофарма», Украина). Кровь мужчин A(II)Rh⁺ группы была предоставлена Харьковским областным центром службы крови, кровь кролика и крысы – виварием Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. Эксперименты проведены в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными V Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2013) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

После удаления плазмы эритроциты трижды отмывали путем центрифугирования (центрифуга

incubation under hypertonic conditions is accompanied by elevated PHL [15].

Targeted modification of different structural and functional cell components is widely used to elucidate how human erythrocytes resist different stress factors. These changes are not strictly specific and may spread to a whole cell. Proceeding from this fact it is expedient to use native (unmodified) erythrocytes of various mammalian species, differing by cytoplasm composition, deformability, activity of transport pathways, phospholipid and protein membrane composition to study the PHL of cells [3, 5, 7, 11, 12]. In addition, in contrast to the PHL of human erythrocytes the features of its development in animal cells have still remained unstudied.

The research aim was to comparatively investigate the features of posthypertonic lysis manifestation in human, rat, and rabbit erythrocytes when varying NaCl concentration in dehydration medium, cell incubation duration and temperature.

Materials and methods

The research was performed in the erythrocytes derived from human (*Homo sapiens*), rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and rat (*Rattus norvegicus*) blood, preserved with Glugicir hemopreservative (Biofarma, Ukraine). Men blood A(II)Rh⁺ group was provided by the Kharkov Regional Center of Blood Service, rabbit and rat blood was obtained in the animal house of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine. The experiments were carried out in accordance with the General Principles of Experiments in Animals, approved by the 5th National Congress in Bioethics (Kiev, 2013) and agreed with the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

After plasma removal the erythromass was thrice washed by centrifugation (centrifuge OPN-3U4.2, Kyrgyzstan) at 3000 rpm for 3 min in a 10-fold volume of physiological solution (0.15 mol/l NaCl; 0.01 mol/l phosphate buffer, pH 7.4). Buffy coat layer and supernatant were aspirated. Erythrocytes were stored as a dense sediment not longer as 4 hrs under 0°C. All the media were prepared with 0.01 mol/l phosphate buffer, pH 7.4. We used here the home-produced reagents of ‘chemically pure’ and ‘chemically pure for analysis’ grades.

Posthypertonic lysis was performed by transferring the erythrocytes from hypertonic solutions, hereinafter dehydration media, into isotonic medium (rehydration medium) at 37 or 0°C. The dehydration media contained sodium chloride ranging within concentrations of 1.0–2.0 mol/l, the rehydration medium did 0.15 mol/l. The effect of erythrocytes incubation duration in



«ОПн-3У4.2», Кыргызстан) при 3000 об/мин в течение 3 мин в 10-кратном объеме физиологического раствора (NaCl 0,15 моль/л; фосфатный буфер 0,01 моль/л, pH 7,4). Лейкоцитарную пленку и супернатант удаляли аспирацией. Эритроциты хранили в виде плотного осадка не более 4 ч при температуре 0°C. Все среды готовили на фосфатном буфере (0,01 моль/л), pH 7,4. В работе были использованы реактивы отечественного производства квалификации «х.ч.» и «ч.д.а.».

Постгипертонический лизис осуществляли перенесением эритроцитов из гипертонических растворов, называемых средами дегидратации, в изотоническую среду (среда регидратации) при 37 или 0°C. Среда дегидратации содержала хлорид натрия в диапазоне концентраций 1,0–2,0 моль/л, среда регидратации – 0,15 моль/л. Влияние продолжительности инкубирования эритроцитов в средах дегидратации и регидратации на развитие ПГЛ эритроцитов изучали в двух постановках. В первой постановке изменяли продолжительность инкубирования клеток в среде дегидратации от 3 до 60 мин, а время пребывания клеток в среде регидратации оставалось неизменным – 5 мин. Во второй постановке после 20 мин экспозиции клеток в среде дегидратации, эритроциты инкубировали в среде регидратации разное время (3–60 мин). Конечный гематокрит – 0,4%.

Уровень гемолиза эритроцитов измеряли спектрофотометрическим методом при длине волны 543 нм и вычисляли в процентах по отношению к полному гемолизу. За 100% принимали поглощение пробы, в которую добавляли тритон X-100 («Merck», Германия) в концентрации 0,1%.

Выход катионов калия из эритроцитов в гипертонических средах определяли с помощью ионометра универсального «ЭВ-74» (Белоруссия) с использованием ионселективного электрода «ЭЛИС-121К» и электрода сравнения «ЭВЛ-1М3.1». Концентрацию катионов калия измеряли в супернатанте суспензии эритроцитов (гематокрит 20%). Для получения 100% выхода внутриклеточных катионов калия эритроциты подвергали 3-разовому циклу замораживания-отогрева.

Осмоляльность растворов веществ определяли криоскопическим методом с использованием осмометра «ОМКА-1Ц-01» (Украина).

Статистическую обработку полученных числовых данных проводили с помощью программы «Statistica 6.0» («StatSoft Inc.», США). Экспериментальные данные представлены как медиана и интерквартильный интервал (Q1–Q3). Для проверки статистической значимости различий исследуемых числовых показателей использовали критерий Манна-Уитни.

dehydration and rehydration media on erythrocyte PHL development was studied in two designs. In the first one we changed the duration of cell incubation in dehydration medium from 3 to 60 min, and the time of cell staying in rehydration medium remained unchanged: 5 min. In the second design after 20 min cell exposure in dehydration medium the erythrocytes were incubated in rehydration medium for different time (3–60 min). The final hematocrit was 0.4%.

Erythrocyte hemolysis was measured spectrophotometrically at 543 nm and expressed in percents of total hemolysis. Absorption of erythrocytes sample supplemented with 0.1% triton X-100 (Merck, Germany) was assumed as 100% hemolysis.

Potassium cation release from erythrocytes in hypertonic media was determined with universal ionometer EV-74 (Belarus) equipped with ion-selective electrode ELIS-121K and reference electrode EVL-1M3.1. Potassium cation concentration was measured in the supernatant of erythrocyte suspensions (20% hematocrit). Erythrocytes were exposed to 3-fold freeze-thawing cycle to obtain 100% release of intracellular potassium cations.

The osmolality of substance solutions was determined by cryoscopic method using osmometer ОМКА-1С-01 (Ukraine).

The obtained data were statistically processed using Statistica 6.0 software (StatSoft Inc., USA). Experimental data were presented as median and interquartile range (Q1–Q3). Mann-Whitney test was used to examine the statistical significance of differences of the studied values.

Results and discussion

In order to evaluate the contribution of the processes, developing at both PHL stages, we varied the time of mammalian erythrocyte staying in hypertonic and isotonic media (Fig. 1 and 2, respectively). In the first experimental design the duration of cell incubation under hypertonic conditions was changed from 3 min up to 60 min, and the time of cell staying under isotonic conditions was 5 min (Fig. 1). In the second design after 20 min cell exposure in hypertonic medium the erythrocytes were incubated within different time (3–60 min) under isotonic conditions (Fig. 2).

The data (Fig. 1) on the various duration of cell incubation under hypertonic conditions demonstrate that principal events consisting in a hemolytic damage of erythrocytes after transferring under isotonic conditions occur within the first 20 min both at 37 and 0°C. This is typical for erythrocytes of all the studied mammals. Of note are the peculiarities of PHL development in human erythrocytes at 0°C, consisting in a sharp increase in cell hemolysis level after incubation in hypertonic medium for 3–20 minutes (Fig. 1).



Результаты и обсуждение

Для того, чтобы оценить вклад процессов, развивающихся на обоих этапах ПГЛ, варьировали время нахождения эритроцитов млекопитающих в гипертонической и изотонической средах (рис. 1 и 2 соответственно). В первой постановке эксперимента изменяли продолжительность инкубирования клеток в гипертонических условиях от 3 до 60 мин, а время пребывания клеток в изотонических условиях составляло 5 мин (см. рис. 1). Во второй постановке после 20 мин экспозиции клеток в гипертонической среде, эритроциты инкубировали разное время (3–60 мин) в изотонических условиях (рис. 2).

Как видно из представленных данных (см. рис. 1), варьирование продолжительности инкубирования клеток в гипертонических условиях показало, что основные события, которые проявляются в гемолитическом повреждении эритроцитов после переноса в условия изотонии, происходят в первые 20 мин как при 37, так и 0°C. Это характерно для эритроцитов всех исследуемых млекопитающих. Следует отметить особенности развития ПГЛ эритроцитов человека при 0°C, которые заключаются в резком увеличении уровня гемолита клеток после инкубирования в гипертонической среде в течение 3–20 мин (см. рис. 1).

При варьировании продолжительности инкубирования на этапе регидратации клеток человека, кролика и крысы получены временные зависимости уровня ПГЛ. Типичная временная зависимость ПГЛ представлена на примере клеток кролика (рис. 2).

Результаты сравнительного анализа данных (рис. 1 и 2) свидетельствуют о том, что на ПГЛ

By varying the incubation duration at the rehydration stage of human, rabbit and rat cells we obtained the time dependences of the PHL level. Typical time dependence of PHL is shown using rabbit cells as an example (Fig. 2).

The results of comparative analysis of the data presented in Fig. 1 and 2 testify to the fact that the erythrocyte PHL is affected in greater extent by a change in cell incubation duration under hypertonic conditions than under isotonic ones. Therefore the dehydration may be suggested as a leading process at PHL, but the rehydration is considered as the factor, enabling to 'manifest' or 'fix' the events, developing during cell dehydration in hypertonic medium. Herewith it should be noted that even 5-min cell incubation in isotonic medium is sufficient for this 'manifestation'.

In order to study the effect of hypertonic medium osmolality on the PHL development the human and animals erythrocytes were incubated in the media with different NaCl content, and then transferred into physiological saline (Fig. 3). The PHL level of human erythrocyte depended evidently on the hypertonic medium osmolality and increased with a rise in saline concentration. This correlates with the previous findings. In particular, O.A. Olejnik [14] has shown, that human erythrocytes, being in the media containing 3 and 1.5 mol/l NaCl, should be incubated in it within 10 sec and 45 min, respectively, to obtain the comparable values of PHL. Thus, an increase in the medium osmolality enables a more rapid achievement of the certain PHL level observed in the cells.

Analysis of the effect of different salt concentrations in dehydration medium on animal erythrocyte PHL (Fig. 3) showed the rise in PHL level with

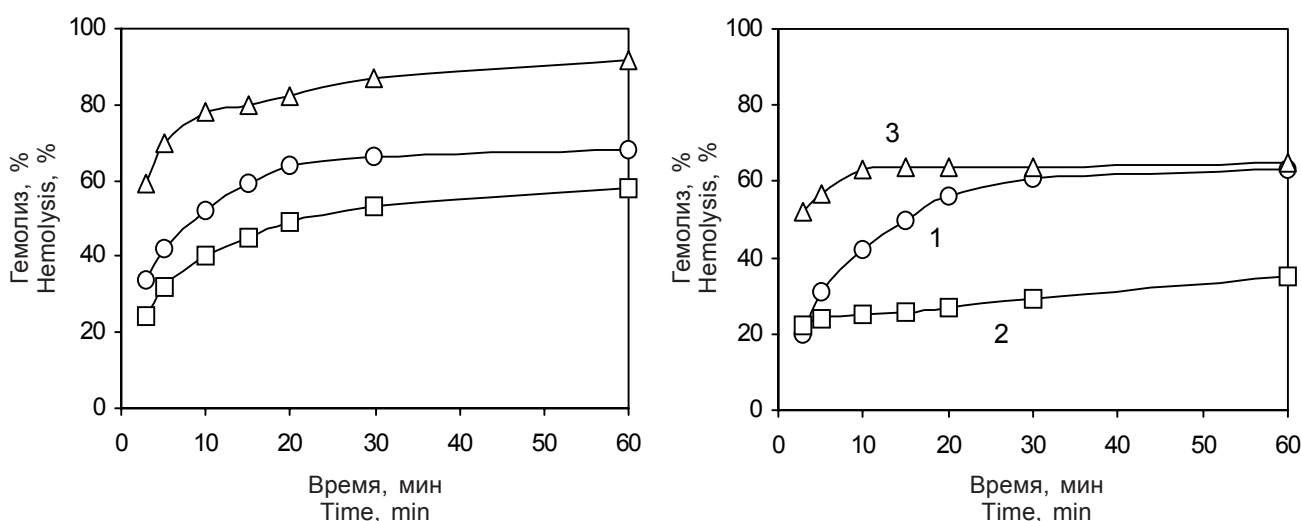


Рис. 1. Зависимость постгипертонического гемолита эритроцитов млекопитающих от продолжительности инкубирования в среде, содержащей 1,75 моль/л NaCl, при 37 (А) и 0°C (В): 1 – человек, 2 – кролик, 3 – крыса.
Fig. 1. Dependence of posthypertonic hemolysis of mammalian erythrocytes on incubation duration in the medium containing 1.75 mol/l NaCl, at 37 (A) and 0°C (B): 1 – human, 2 – rabbit, 3 – rat.

эритроцитов больше влияет изменение продолжительности инкубирования клеток в условиях гипертонии, чем изотонии. Поэтому можно полагать, что при ПГЛ ведущим процессом является дегидратация, а регидратация рассматривается как фактор, позволяющий «проявить» или «зафиксировать» события, развивающиеся при дегидратации клеток в гипертонической среде. При этом следует отметить, что вполне достаточно для этого «проявления» всего 5 мин инкубирования клеток в изотонической среде.

Для исследования влияния осмоляльности гипертонической среды на развитие ПГЛ эритроциты человека и животных инкубировали в средах с различным содержанием NaCl, а затем переносили в физиологический раствор (рис. 3). Как видно, уровень ПГЛ эритроцитов человека зависит от осмоляльности гипертонической среды и повышается с увеличением в ней концентрации соли. Это согласуется с ранее полученными данными. Так, было показано О.А. Олейник [6], что для получения соизмеримых величин ПГЛ эритроциты человека, которые находятся в средах, содержащих 3 и 1,5 моль/л NaCl, должны инкубироваться в них 10 с и 45 мин соответственно. Таким образом, повышение осмоляльности среды позволяет быстрее достигнуть определенного уровня ПГЛ клеток.

При исследовании влияния разных концентраций соли в среде дегидратации на ПГЛ эритроцитов животных (рис. 3) показано повышение уровня ПГЛ с увеличением концентрации соли в гипертонической среде. При этом наблюдается незначительный уровень гемолиза клеток, перенесенных в изотонию из 1,0 моль/л NaCl (не превышает 10%), основные повреждения эритроцитов происходят при использовании более высоких концентраций соли. Поскольку этап регидратации только проявляет изменения, происходящие с клетками на этапе дегидратации (см. рис. 2), представляло интерес исследовать состояние плазматической мембраны эритроцитов в условиях гипертонии. С этой целью изучали барьерную функцию мембраны эритроцитов по отношению к ионам калия, которые являются доминирующими внутриклеточными катионами. В отличие от клеток человека и крысы для эритроцитов кролика степень гемолитического повреждения ниже, следовательно они более устойчивы к ПГЛ (рис. 3). Поэтому для сравнительной оценки барьерной функции мембран по выходу внутриклеточных катионов калия были выбраны «устойчивые» эритроциты кролика и «неустойчивые» клетки человека.

Как видно из рис. 4, с ростом концентрации соли в среде наблюдается увеличение выхода калия из клеток млекопитающих. Следует отметить, что во всем диапазоне концентраций NaCl уровень потери

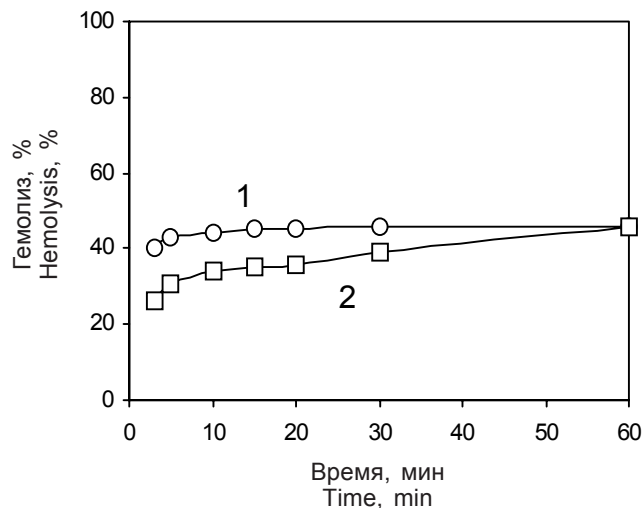


Рис. 2. Постгипертонический гемолиз эритроцитов кролика в зависимости от продолжительности инкубирования клеток в изотонических условиях. Эритроциты переносили из 1,75 в 0,15 моль/л NaCl при температуре 37 (1) и 0°C (2).

Fig. 2. Posthypertonic hemolysis of rabbit erythrocytes depending on duration of cell incubation under isotonic conditions. Erythrocytes were transferred from 1.75 into 0.15 mol/l NaCl at 37 (1) and 0°C (2).

increasing salt concentration in hypertonic medium. Herewith an insignificant hemolysis (not exceeding 10%) of cells was observed following transfer into isotonic solution from 1.0 mol/l NaCl, the main damages of erythrocytes occurred when using higher salt concentrations. Since the rehydration step only manifests the changes occurring with the cells at dehydration stage (Fig. 2), of interest was to investigate the state of erythrocyte plasma membrane under hypertonic conditions. For this purpose we studied the erythrocyte membrane barrier function for potassium ions, being the dominant intracellular cations. In contrast to human and rat cells, the degree of hemolytic damage in rabbit erythrocytes is lower, so they are more resistant to PHL (Fig. 3). Therefore, we selected the ‘resistant’ rabbit erythrocytes and ‘non-resistant’ human cells for a comparative assessment of membrane barrier function by a release of intracellular potassium cations.

The Fig. 4 demonstrates an increase in potassium release from mammalian cells occurring with rising salt concentration in the medium. It should be noted that within all the range of NaCl concentrations the amount of potassium lost by rabbit cells is lower than by human erythrocytes.

The Fig. 5 demonstrates the hemolysis values of human, rat and rabbit erythrocytes, obtained when transferring them from hypertonic media (1.75 or 2.0 mol/l NaCl) into isotonic saline (0.15 mol/l NaCl) which were analysed to find how temperature affects mammalian erythrocytes’ sensitivity to the PHL action.



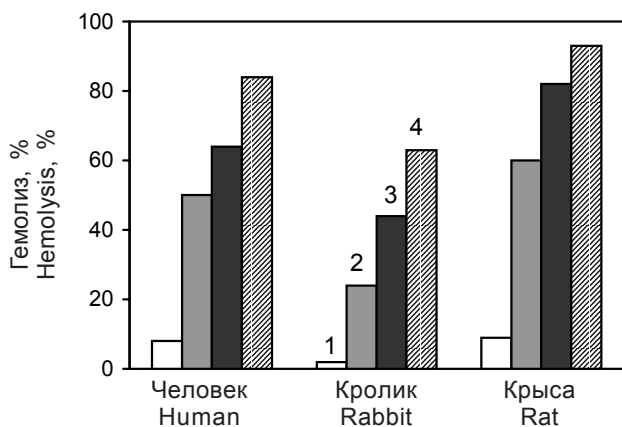


Рис. 3. Зависимость постгипертонического гемолиза эритроцитов млекопитающих от концентрации хлорида натрия на этапе гипертонического инкубирования клеток при 37°C (1 – 1,0 моль/л NaCl, 2 – 1,5 моль/л NaCl, 3 – 1,75 моль/л NaCl, 4 – 2,0 моль/л NaCl).

Fig. 3. Dependence of posthypertonic hemolysis of mammalian erythrocytes on sodium chloride concentration at the stage of cell hypertonic incubation under 37°C (1 – 1.0 mol/l NaCl, 2 – 1.5 mol/l NaCl, 3 – 1.75 mol/l NaCl, 4 – 2.0 mol/l NaCl).

калия клетками кролика ниже, чем эритроцитами человека.

Для сравнительного анализа влияния температуры на чувствительность эритроцитов млекопитающих к действию ПГЛ на рис. 5 представлены значения гемолиза эритроцитов человека, кролика и крысы, полученные при перенесении их из гипертонических сред (1,75 или 2,0 моль/л NaCl) в изотонический раствор (0,15 моль/л NaCl).

При 37°C уровень гемолиза эритроцитов человека в изотоническом растворе после инкубирования в 1,75 моль/л NaCl составляет 64%. При 0°C в аналогичных условиях наблюдается незначительное снижение уровня ПГЛ клеток человека. Увеличение концентрации соли до 2,0 моль/л на этапе дегидратации клеток приводит к росту ПГЛ эритроцитов человека как при 37, так и при 0°C. Результаты анализа полученных данных позволяют сделать вывод о том, что ПГЛ эритроцитов человека зависит от осмоляльности среды дегидратации и в меньшей степени определяется температурой.

Уровень ПГЛ для эритроцитов кролика ниже по сравнению с клетками человека. Это показано при использовании обеих гипертонических сред (1,75 и 2,0 моль/л NaCl). Следует отметить, что для клеток кролика, кроме осмоляльности гипертонической среды, важным фактором развития ПГЛ является температура. Из рис. 5 видно, что при 0°C уровень гемолиза клеток кролика ниже, чем при 37°C.

Из всех исследованных эритроцитов клетки крысы повреждаются в большей степени при всех

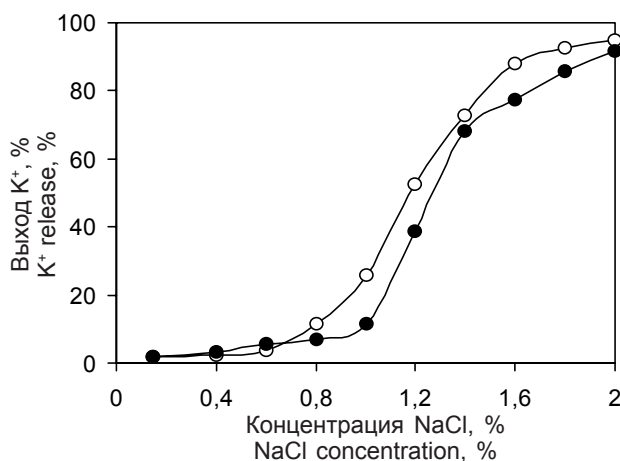


Рис. 4. Выход K⁺ из эритроцитов человека (1) и кролика (2) в гипертонических средах.

Fig. 4. Potassium release from human (1) and rabbit (2) erythrocytes in hypertonic media.

At 37°C the level of human erythrocyte hemolysis in isotonic solution after incubating in 1.75 mol/l NaCl was 64%. At 0°C and under similar conditions a slight decrease in PHL level of human cells was observed. The augmentation of salt concentration up to 2.0 mol/l at the dehydration stage resulted in the increased human erythrocyte PHL both at 37 and at 0°C. Analysis of the findings suggested the dependence of human erythrocyte PHL on the osmolality of dehydration medium and the temperature, but in lesser extent.

The PHL level for rabbit erythrocytes was lower as compared to the human cells. It was demonstrated when both hypertonic media (1.75 and 2.0 mol/l NaCl) were used. It should be noted that for rabbit cells an important factor of PHL development was the temperature in addition to the hypertonic medium osmolality. The Fig. 5 shows that hemolysis level of rabbit cells at 0°C was lower than at 37°C.

Among all the studied erythrocytes the rat cells were the most damaged under all experimental conditions of PHL (Fig. 5). Herewith the level of rat erythrocyte hemolysis was higher when increasing both salt concentration and medium temperature. The results of comparative analysis of mammalian erythrocyte PHL demonstrated a more pronounced temperature dependence of rat and rabbit erythrocytes as compared to human cells.

Of note is the fact, that the certain combinations of two experimental parameters (temperature and salt concentration in the medium) allow obtaining the similar PHL levels of rabbit and rat erythrocytes. The combination of lower osmolality (1.75 mol/l NaCl) and

экспериментальных условиях ПГЛ (рис. 5). При этом уровень гемолиза эритроцитов крысы выше при увеличении как концентрации соли, так и температуры среды. Результаты сравнительного анализа ПГЛ эритроцитов млекопитающих показывают более выраженную зависимость от температуры эритроцитов крысы и кролика по сравнению с клетками человека.

Следует обратить внимание на то, что определенные комбинации двух экспериментальных параметров (температуры и концентрации соли в среде) позволяют получить соизмеримые уровни ПГЛ эритроцитов как кролика, так и крысы. Сочетание низкой осмоляльности (1,75 моль/л NaCl) и высокой температуры (37°C), как и комбинирование высокой осмоляльности (2,0 моль/л NaCl) и низкой температуры (0°C), приводит к примерно 50%-му уровню гемолиза клеток кролика и 80%-му повреждению эритроцитов крысы. Влиянию определенных комбинаций экспериментальных условий при формировании двухфазной водной системы посвящена работа R. Sadeghi и B. Jamehbozorg [19]. Так, формирование двухфазной системы наблюдалось при более высоких значениях температуры и более низких концентрациях соли (дигидрофосфат натрия) при неизменной концентрации полимера (полипропиленгликоль). Кроме того, в работе D.Y. Gao и соавт. [13] для сперматозоидов человека показана зависимость ПГЛ от осмоляльности среды и температуры: с ростом концентрации хлорида натрия или сахарозы в среде дегидратации, а также с увеличением температуры наблюдается снижение устойчивости этих клеток к перенесению в условия изотонии.

По повышению устойчивости эритроцитов млекопитающих к действию ПГЛ клетки можно расположить в такой последовательности: крыса, человек, кролик. Анализ фосфолипидного состава плазматических мембран эритроцитов показал аналогичное расположение по увеличению содержания мембранного фосфатидилэтаноламина (ФЭА) [21]. Для гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих показана отрицательная корреляция между содержанием неламеллярного фосфолипида ФЭА и уровнем гемолиза: чем выше содержание ФЭА, тем ниже повреждение клетки при действии температурно-осмотического стресса [9]. Максимальная устойчивость к ПГЛ эритроцитов

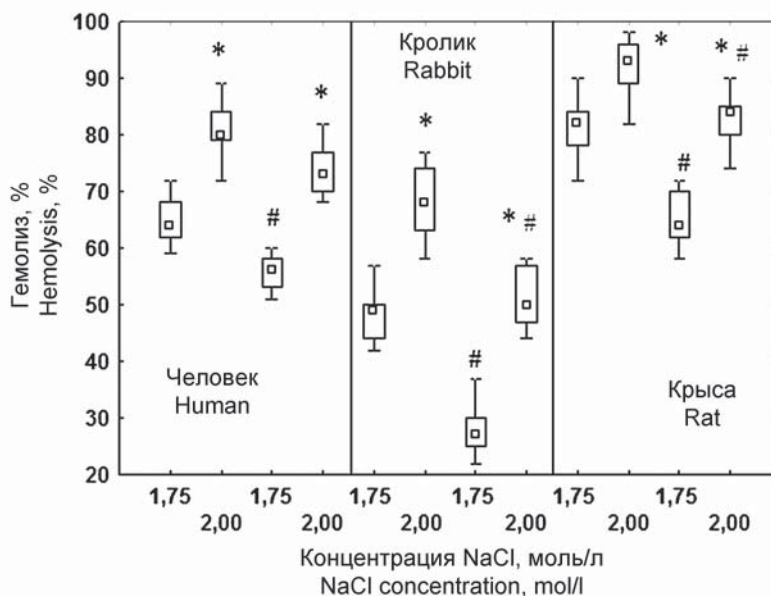


Рис. 5. Уровень гемолиза эритроцитов млекопитающих при перенесении из гипертонических растворов хлорида натрия в среду, содержащую 0,15 моль/л NaCl, при 37 (■) и 0°C (□); □ – медиана, □ – интерквартильный интервал (Q1–Q3), I – максимальное-минимальное значение (*, # – статистически значимые отличия по сравнению с данными для 1,75 моль/л NaCl и температуры 37°C соответственно ($p < 0,05$), количество наблюдений в каждой группе – 9).

Fig. 5. Hemolysis level of mammalian erythrocytes when transferred from hypertonic sodium chloride solutions into the medium containing 0.15 mol/l NaCl, at 37 (■) and 0°C (□); □ – median, □ – interquartile range (Q1–Q3), I – the maximum-minimum value (*, # – statistically significant differences as compared to data for 1.75 mol/l NaCl and 37°C temperature, respectively ($p < 0.05$), number of observations in each group was 9).

higher temperature (37°C) as well as that of higher osmolality (2.0 mol/l NaCl) and lower temperature (0°C) resulted in approximate 50% cell hemolysis of rabbit cells and 80% of damaged rat erythrocytes. The effect of the certain combinations of experimental conditions on two-phase aqueous system formation was elucidated in the paper of R. Sadeghi and B. Jamehbozorg [17]. The two-phase system was formed at higher temperature values and lower salt concentrations (sodium dihydrogen phosphate) under a constant concentration of polymer (polypropylene glycol). In addition, D.Y. Gao *et al.* [8] demonstrated the following dependency of PHL on medium osmolality and temperature for human spermatozoa: with increasing concentration of either sodium chloride or sucrose in dehydration medium, as well as with rising the temperature there was observed a decrease in resistance of these cells to a transfer under isotonic conditions.

By an increase in mammalian erythrocyte resistance to PHL effect the cells may be arranged in the following sequence: rat, human, rabbit. Analysis of phospholipid composition of erythrocyte plasma membrane showed a similar arrangement by the increase in the membrane phosphatidyl ethanolamine



кролика (рис. 1, 3, 5), мембраны которых характеризуются высоким содержанием неламинарного ФЭА, может определяться нарушением непрерывности ламеллярной упаковки липидного бислоя в результате образования в нем гексагональных структур [20]. При изменении физических параметров растяжимости бислоя (мембрана становится более лабильной) [20] снижается напряжение на мембране, возникающее при действии стрессового фактора, и предотвращается развитие гемолитических пор.

Устойчивые к ПГЛ эритроциты кролика хорошо переносят действие гипертонического и холодового шоков [9]. Эритроциты кролика не содержат гликофорин А [14], поэтому их мембраны характеризуются меньшей способностью связывать гемоглобин [18]. Это определяет селективную проницаемость мембран для катионов и устойчивость клеток кролика к действию стрессовых факторов.

Постгипертонический лизис эритроцитов развивается при возвращении клеток в изотонический раствор из гипертонической среды. При переносе эритроцитов в гипертонический раствор происходит сжатие клеток в результате быстрого выхода из них воды. Кроме того, в эритроциты могут проникать внеклеточные вещества, поэтому при переносе в изотонический раствор в клетки должно войти больше воды, чем было удалено на стадии дегидратации. При этом мембраны будут растягиваться до такой степени, что может наступить их механическое разрушение [1].

К. Muldrew [17] предложил гипотезу для объяснения постгипертонического лизиса эритроцитов. Во время медленного замораживания клеток образование внеклеточного льда приводит к потере клеточной воды, что увеличивает концентрацию ионов внутри клетки. При этом солевые мостики между фиксированными зарядами на цитоплазматических белках разрушаются, и белки связывают внутриклеточные ионы. В результате снижается количество ионов в цитоплазме и увеличивается их приток из внеклеточной среды. При отогреве эритроцитов вода проникает во внутриклеточную среду, при этом белки освобождают ионы в ответ на разведение цитоплазмы. Повышение содержания внутриклеточных свободных ионов провоцирует дополнительный вход воды в клетки, что приводит к их набуханию. Лизис эритроцитов произойдет в случае превышения предела упругости плазматической мембраны из-за достижения критического содержания внутриклеточной воды.

Е.А. Гордиенко и соавт. [4] считают, что дегидратация эритроцитов в гипертонической среде приводит к деформации клеточной мембраны по типу изгиба. Деформация мембраны инициирует латеральное перераспределение мембранных компо-

(PEA) content [21]. For hypertonic cryohemolysis of mammalian erythrocytes a negative correlation between the content of non-lamellar phospholipid PEA and haemolysis level was demonstrated: the higher PEA content was, the lower was cell damage under temperature and osmotic stress effects [19]. The maximum resistance of rabbit erythrocytes to PHL (Fig. 1, 3, 5), the membranes of which are characterized by a high content of non-lamellar PEA, may be determined by a disorder in continuity of lipid bilayer lamellar packing as a result of hexagonal structures formation in it [20]. Changes in the physical parameters of bilayer extensibility (membrane becomes more labile) [20] lead to a decrease in the membrane tension, occurring under stress factor effect, and prevention of the hemolytic pore development.

The PHL-resistant rabbit erythrocytes tolerate well the hypertonic and cold shock effects [19]. Rabbit erythrocytes contain no glycoporphin A [10], so their membranes are characterized by lower ability to bind hemoglobin [16]. This determines the selective membrane permeability for cations and rabbit cell resistance to stress factor impact.

Posthypertonic lysis of erythrocytes develops when the cells return into isotonic solution from hypertonic medium. When transferring the erythrocytes into hypertonic solution the cell shrinkage, resulting from a rapid water release out of them, occurs. In addition, the extracellular substances may penetrate into erythrocytes, therefore when transferred into isotonic solution more water may enter the cells, than it was lost at dehydration stage. Herewith the membranes may be stretched up to their mechanical destruction [1].

К. Muldrew [13] proposed the hypothesis to elucidate the posthypertonic lysis of erythrocytes. During slow cell freezing the extracellular ice formation leads to a loss of cellular water, which increases the ion concentration inside a cell. This results in the destruction of salt bridges between fixed charges on cytoplasmic proteins, and binding of the intracellular ions by proteins. As a result the ion number in the cytoplasm reduces and their influx from extracellular medium increases. During erythrocyte thawing the water penetrates into the intracellular medium, and the proteins release ions in response to the cytoplasm dilution. An increased content of intracellular free ions provokes an additional entry of water into the cells, resulting in their swelling. Erythrocyte lysis will occur if the elasticity limit of the plasma membrane would be exceeded due to reaching the critical content of intracellular water.

Е.А. Гордиенко *et al.* [9] believed that erythrocyte dehydration in hypertonic medium resulted in bending-type deformation of cell membrane. The membrane deformation initiates a lateral redistribution of membrane components, contributing to appearance of structural rearrangements in deformed membrane sites,



нентов, что способствует появлению структурных перестроек в деформированных участках мембраны, в которых могут формироваться или проявляться дефекты, проницаемые для катионов [2]. При перенесении таких сенсibilизированных эритроцитов в среду регидратации происходит чрезмерное увеличение их объема в результате компенсирующего осмотический градиент движения воды в клетку, клеточная мембрана растягивается, и мембранные дефекты превращаются в гемолитические поры.

Сравнительное изучение постгипертонического лизиса эритроцитов человека, крысы и кролика (при варьировании концентрации хлорида натрия в среде дегидратации, продолжительности инкубирования клеток и температуры) позволило выявить закономерности развития ПГЛ эритроцитов исследуемых млекопитающих, а также показать особенности проявления ПГЛ, по-видимому, связанные с видовыми различиями состава цитоскелет-мембранного комплекса. Поскольку определяющим для ПГЛ эритроцитов человека, крысы и кролика является этап дегидратации, то в перспективе целесообразно исследовать роль качественного и количественного состава среды дегидратации в развитии ПГЛ эритроцитов разных видов млекопитающих.

Выводы

1. Важным для развития ПГЛ эритроцитов человека, крысы и кролика является этап дегидратации, поскольку концентрация хлорида натрия в среде и продолжительность инкубирования в ней определяют уровень гемолиза клеток млекопитающих при перенесении в изотонические среды.

2. С увеличением концентрации NaCl в среде дегидратации наблюдается рост выхода катионов калия из эритроцитов человека и кролика при возврате клеток в среду регидратации.

3. Уровень ПГЛ эритроцитов млекопитающих определяется температурой сред, причем при 0°C показатели ниже, чем при 37°C.

4. Проведенные в сравнительном аспекте исследования ПГЛ эритроцитов человека, кролика и крысы свидетельствуют о том, что максимальной устойчивостью к действию ПГЛ обладают эритроциты кролика, а минимальной – клетки крысы.

Литература

1. Белоус А.М., Гордиенко Е.А., Розанов Л.Ф. Замораживание и криопротекция. – М.: Высш. шк., 1987. – 81 с.
2. Белоус А.М., Бондаренко В.А., Гулевский А.К. Молекулярно-клеточная концепция криповреждения клетки: роль трансмембранных дефектов // Проблемы криобиологии. – 1987. – №2. – С. 3–10.

and formation or manifestation of defects permeable to cations [2]. When transferring these sensibilized erythrocytes into rehydration medium an excessive increase in their volume occurs, resulting from water influx into a cell and compensating osmotic gradient, the cell membrane is stretched, and membrane defects are transformed into hemolytic pores.

A comparative study of posthypertonic lysis in human, rat and rabbit erythrocytes (by varying sodium chloride concentration in dehydration medium, duration of cell incubation and temperature) enabled to reveal the regularities of PHL development in erythrocytes of the studied mammals, and to demonstrate the features of PHL manifestation, apparently associated with species dependent differences in the composition of cytoskeleton-membrane complex. Since the dehydration stage is determining for PHL of human, rat and rabbit erythrocytes, it is expedient to investigate in future the role of a qualitative and quantitative composition of dehydration medium in PHL development of erythrocytes from different mammalian species.

Conclusions

1. Dehydration stage is important for PHL development of human, rat and rabbit erythrocytes, since the sodium chloride concentration in the medium and the duration of incubation determine the hemolysis level of mammalian cells during a transfer into isotonic media.

2. Increasing NaCl concentration in dehydration medium results in the growth of potassium cation release from human and rabbit erythrocytes when returning cells into rehydration medium.

3. The PHL level in mammalian erythrocytes is determined by temperature of the media, moreover at 0°C the indices are lower than at 37°C.

4. Performed comparative PHL studies in human, rabbit and rat erythrocytes showed that rabbit erythrocytes had the maximum resistance to PHL effect, and the minimum one was found in rat ones.

References

1. Belous A.M., Gordienko E.A., Rozanov L.F. Freezing and cryoprotection. Moscow: Vysshaya Shkola; 1987.
2. Belous A.M., Bondarenko V.A., Gulevsky A.K. The molecular-cellular concept of cell cryoinjury: the role of transmembrane defects. Problems of Cryobiology 1987; (2): 3–10.
3. Benga G. Comparative studies of water permeability of red blood cells from humans and over 30 animal species: an overview of 20 years of collaboration with Philip Kuchel. Eur Biophys J 2013; 42(1): 33–46.
4. Bondarenko V.A., Bondarenko T.P., Rudenko S.V. Effects of dehydration in the control of cold and osmotic cell sensitivity. Problems of Cryobiology 1992; (4): 14–26.
5. Bogner P., Sipos K., Ludany A. et al. Steady-state volumes and metabolism-independent osmotic adaptation in mammalian erythrocytes. Eur Biophys J 2002; 31(2): 145–152.



3. Бондаренко В.А., Бондаренко Т.П., Руденко С.В. Эффекты дегидратации в контроле холодовой и осмотической чувствительности клеток // Проблемы криобиологии. – 1992. – №4. – С. 14–26.
4. Гордієнко Є.О., Товстяк В.В. Фізика біомембран: підручник. – К.: Наук. думка, 2009. – 272 с.
5. Дунаевская О.Н., Панталер Е.Р., Шпакова Н.М., Бондаренко В.А. Некоторые возможности повышения устойчивости эритроцитов к холодовому и гиперосмотическому воздействию при использовании катионных амфипатов // Проблемы криобиологии. – 1995. – №1. – С. 21–27.
6. Олійник О.О. Вплив інгібіторів аніонного транспорту і модифікаторів мембрани на постгіпертонічний лізис еритроцитів: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Харків, 2004. – 18 с.
7. Пателарос С.В., Сыничкова О.П. Осмотическое поведение эритроцитов при постгипертоническом лизисе // Проблемы криобиологии. – 1994. – №3. – С. 35–40.
8. Селье Г. Стресс без дистресса. – М.: Прогресс, 1982. – 128 с.
9. Шпакова Н.М. Температурна та осмотична стійкість еритроцитів різних видів ссавців: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. – Харків, 2014. – 44 с.
10. Benga G. Comparative studies of water permeability of red blood cells from humans and over 30 animal species: an overview of 20 years of collaboration with Philip Kuchel // Eur. Biophys. J. – 2013. – Vol. 42, №1. – P. 33–46.
11. Bogner P., Sipos K., Ludany A. et al. Steady-state volumes and metabolism-independent osmotic adaptation in mammalian erythrocytes // Eur. Biophys. J. – 2002. – Vol. 31, №2. – P. 145–152.
12. Florin-Christensen J., Suarez C. E., Florin-Christensen M. et al. A unique phospholipid organization in bovine erythrocyte membranes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol. 98, №14. – P. 7736–7741.
13. Gao D.Y., Ashworth E., Watson P.F. et al. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis // Biol. Reprod. – 1993. – Vol. 49, №1. – P. 112–123.
14. Ligi F., Ciacci C., Palma F., Palma F. Comparative study of the cytoplasmic domain of band 3 from human and rabbit erythrocyte membranes // Comp. Biochem. Physiol. B. – 1998. – Vol. 121, №3. – P. 265–271.
15. Liu L., Lei T., Bankir L. et al. Erythrocyte permeability to urea and water: comparative study in rodents, ruminants, carnivores, humans, and birds // J. Comp. Physiol. B. – 2011. – Vol. 181, №1. – P. 65–72.
16. Matei H., Frentescu L., Benga Gh. Comparative studies of the protein composition of red blood cell membranes from eight mammalian species // J. Cell. Mol. Med. – 2000. – Vol. 4, №4. – P. 270–276.
17. Muldrew K. The salting-in hypothesis of post-hypertonic lysis // Cryobiology. – 2008. – Vol. 57, №3. – P. 251–256.
18. Rauenbuehler P.B., Cordes K.A., Salhany J.M. Identification of the haemoglobin binding sites on the inner surface of the erythrocyte membrane // Biochim. Biophys. Acta. – 1982. – Vol. 692, №3. – P. 361–370.
19. Sadeghi R., Jamehbozorg B. Effect of temperature on the salting-out effect and phase separation in aqueous solutions of sodium di-hydrogen phosphate and poly (propylene glycol) // Fluid Phase Equilibria. – 2008. – Vol. 271. – P. 13–18.
20. Tan Y., Sun D., Wang J., Huang W. Mechanical characterization of human red blood cells under different osmotic conditions by robotic manipulation with optical tweezers // IEEE Trans. Biomedical Engineering. – 2010. – Vol. 57, №7. – P. 1816–1825.
21. Wessels J.M.C., Veerkamp J.H. Some aspects of the osmotic lysis of erythrocytes III. Comparison of glycerol permeability and lipid composition of red blood cell membranes from eight mammalian species // Biochim. Biophys. Acta. – 1973. – Vol. 291, №1. – P. 190–196.
6. Dunayevskaya O.N., Pantaler E.R., Shpakova N.M., Bondarenko V.A. Some possible methods of increasing red blood cell stability to the action of cold and osmotic effects after application of cation amphipates. Problems of Cryobiology 1995; (1): 21–26.
7. Florin-Christensen J., Suarez C.E., Florin-Christensen M. et al. A unique phospholipid organization in bovine erythrocyte membranes. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98(14): 7736–7741.
8. Gao D.Y., Ashworth E., Watson P.F. et al. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. Biol Reprod 1993; 49(1): 112–123.
9. Gordienko E.A., Tovstyak V.V. Physics of biological membranes: a tutorial. Kiev: Nauk. Dumka; 2009.
10. Ligi F., Ciacci C., Palma F., Palma F. Comparative study of the cytoplasmic domain of band 3 from human and rabbit erythrocyte membranes. Comp Biochem Physiol B 1998; 121(3): 265–271.
11. Liu L., Lei T., Bankir L. et al. Erythrocyte permeability to urea and water: comparative study in rodents, ruminants, carnivores, humans, and birds. J Comp Physiol B 2011; 181(1): 65–72.
12. Matei H., Frentescu L., Benga Gh. Comparative studies of the protein composition of red blood cell membranes from eight mammalian species. J Cell Mol Med 2000; 4(4): 270–276.
13. Muldrew K. The salting-in hypothesis of post-hypertonic lysis. Cryobiology 2008; 57(3): 251–256.
14. Oliynyk O.A. The effect of anion transport inhibitors and membrane modifiers on posthypertonic lysis of erythrocytes. [dissertation]. Kharkiv; 2004.
15. Patelaros S.V., Synchikova O.P. Osmotic behavior of red blood cells during posthypertonic lysis. Problems of Cryobiology 1994; (3): 35–40.
16. Rauenbuehler P.B., Cordes K.A., Salhany J.M. Identification of the haemoglobin binding sites on the inner surface of the erythrocyte membrane. Biochim Biophys Acta 1982; 692(3): 361–370.
17. Sadeghi R., Jamehbozorg B. Effect of temperature on the salting-out effect and phase separation in aqueous solutions of sodium di-hydrogen phosphate and poly (propylene glycol). Fluid Phase Equilibria 2008; 271: 13–18.
18. Selye H. Stress without distress. Moscow: Progress; 1982.
19. Shpakova N.M. Temperature and osmotic resistance of erythrocytes of different mammalian species. [dissertation]. Kharkiv; 2014.
20. Tan Y., Sun D., Wang J., Huang W. Mechanical characterization of human red blood cells under different osmotic conditions by robotic manipulation with optical tweezers. IEEE Trans Biomedical Engineering 2010; 57(7): 1816–1825.
21. Wessels J.M.C., Veerkamp J.H. Some aspects of the osmotic lysis of erythrocytes III. Comparison of glycerol permeability and lipid composition of red blood cell membranes from eight mammalian species. Biochim Biophys Acta 1973; 291(1): 190–196.

