

УДК 57.086.13:577.352.4:611.018.51

Н.М. Шпакова*, Н.В. Орлова

До питання щодо механізму осмотичної стійкості еритроцитів ссавців

UDC 57.086.13:577.352.4:611.018.51

N.M. Shpakova*, N.V. Orlova

About the Mechanism of Mammalian Erythrocytes Osmotic Stability

Реферат: У роботі досліджено особливості дії гіпертонічного шоку та гіпотонічного стресу на еритроцити різних видів ссавців (людина, бик, кінь, кролик, собака, щур). На підставі результатів кореляційного аналізу (із використанням коефіцієнта рангової кореляції Спірмена) оцінено зв'язок між показниками осмотичної чутливості еритроцитів ссавців і загальновідомими структурно-функціональними характеристиками цих клітин. У роботі представлені та проаналізовані статистично значущі зв'язки. Встановлено, що в умовах гіпотонічного стресу еритроцитів ссавців значення порогових концентрацій NaCl і величини осмотичної крихкості корелюють із розмірами клітин (діаметр). За умов гіпертонічного шоку еритроцитів ссавців значення порогових концентрацій NaCl і величини гемолізу клітин у середовищі, що містить 4,0 моль/л NaCl, корелюють із проникністю мембрани для води. Еритроцити ссавців із високим значенням коефіцієнта дифузійного водного транспорту через білкові канали більш стійкі до дії гіпертонічного шоку.

Ключові слова: еритроцити ссавців, гіпертонічний шок, гіпотонічний стрес, кореляційний аналіз, коефіцієнт рангової кореляції Спірмена.

Abstract: The peculiarities of the effect of hypertonic shock and hypotonic stress on erythrocytes of different species of mammals (human, bull, horse, rabbit, dog, rat) have been investigated. Based on the results of correlation analysis (using the Spearman's rank correlation coefficient), the relationship between osmotic sensitivity of mammalian erythrocytes and the well-known structural and functional characteristics of these cells was assessed. The paper presents and analyzes the significant relationships. Under hypotonic stress of mammalian erythrocytes, the values of the threshold concentration of NaCl and the one of osmotic fragility were found to correlate with the size of cells (diameter). Under hypertonic shock of mammalian erythrocytes, the values of the threshold concentrations of NaCl and that of hemolysis of cells in a medium containing 4.0 mol/L NaCl correlated with the membrane permeability to water. Mammalian erythrocytes with a high value of the coefficient of diffusion water transport due to the protein channels are more resistant to hypertensive shock.

Key words: mammalian erythrocytes, hypertonic shock, hypotonic stress, correlation analysis, Spearman's rank correlation coefficient.

Еритроцити – високоспеціалізовані клітини, основною функцією яких є перенесення кисню з легенів до тканин і вуглекислого газу в зворотному напрямку. Метаболізм еритроцитів, представлений в основному анаеробним гліколізом, характеризується продукуванням значної кількості 2,3-дифосфогліцеринової кислоти, яка регулює спорідненість гемоглобіну до кисню.

У організмі еритроцити зберігають цілісність і функціональну активність за значної зміни осмотичного тиску [29, 31]. Зокрема, під час проходження через мозкову речовину нирок ці клітини піддаються перепаду осмотичного тиску (осмоляльності): спочатку вони підпадають під дію гіпертонії, а після під вплив осмотичного тиску, який знижується до досягнення ізотонічного рівня, характерного для кровоносного русла [3]. Проте після перевищення певних

Erythrocytes are highly specialized cells the main function of which is an oxygen transportation from the lungs to the tissues and carbon dioxide in an opposite direct ion. Erythrocyte metabolism, represented mainly by anaerobic glycolysis, is characterized with the production of significant amounts of 2,3-diphosphoglyceric acid, which regulates the affinity of hemoglobin for oxygen.

In the body, erythrocytes retain integrity and functional activity with notable changes in osmotic pressure [29, 31]. In particular, when passing through the renal medulla, these cells are exposed to a drop in osmotic pressure (osmolality): first they are exposed to hypertonia, and then under the influence of osmotic pressure, which decreases to reach the isotonic level, characteristic of the bloodstream [31]. However, after exceeding the certain threshold values of the medium osmola-

Відділ кріоцитології, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

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

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

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

*To whom correspondence should be addressed:

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

Надійшла 17.04.2019

Прийнята до друку 09.11.2020

Received April, 17, 2019

Accepted November, 09, 2020

© 2020 N.M. Shpakova, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

порогових значень осмоляльності середовища еритроцити піддаються руйнуванню та лізують. Причому це властиво клітинам, що знаходяться у середовищах як із низьким, так і високим значенням осмоляльності [5, 17]. Отже, у першому випадку на клітини діє гіпотонічний стрес (ГС), а в другому – гіпертонічний шок (ГШ).

Результатом впливу ГШ на еритроцити є розвиток гіпертонічного гемолізу, який входить до сфери досліджень кріобіологів, оскільки при низькотемпературному консервуванні в процесі виморожування вільної води відбувається значне підвищення концентрації солей у позаклітинному середовищі [1, 15]. Вивчення пошкодження еритроцитів за умов ГШ необхідно для розробки способів підвищення їх стійкості в процесі кріо-консервування.

Стан клітин, підданих дії екстремальних факторів [21–23], оцінюють за параметром осмотичної крихкості, тобто за концентрацією гіпотонічного розчину хлориду натрію, при якій гемоліз еритроцитів становить 50%. Крім того, ГС використовують із метою діагностики функціональних розладів системи кровообігу і оцінки стану еритроцитів [19, 25], а також у випадку їх цілеспрямованого навантаження лікарськими речовинами [16, 32].

Виходячи з вищевикладеного вивчення причин, закономірностей, механізмів гіпотонічного та гіпертонічного лізису еритроцитів людини важливе для фундаментальних і прикладних досліджень.

Для з'ясування механізмів стійкості еритроцитів людини до дії стресових факторів широко використовується підхід, пов'язаний із спрямованою модифікацією різних структурних і функціональних їх компонентів. Така модифікація не є вузько специфічною і може впливати на клітину в цілому, тобто тією чи іншою мірою порушувати її нативність. У зв'язку з цим для вивчення осмотичної чутливості клітин доцільно використовувати нативні еритроцити різних видів ссавців. Ці клітини відрізняються за складом цитоплазми і мембрани, здатністю до деформації, активністю транспортних шляхів [7, 12, 14, 20]. Дослідження осмотичної стійкості еритроцитів ссавців дозволять визначити особливості та закономірності її прояву. Кореляційний аналіз оцінки сили зв'язку між осмотичними показниками і характеристиками (розмір, особливості складу цитоплазми та мембрани) еритроцитів різних видів ссавців дозволить наблизитися до розуміння механізмів осмотичної чутливості клітин.

Мета роботи – дослідження особливостей дії гіпертонічного шоку та гіпотонічного стресу на

lity, the erythrocytes are destroyed and lysed. Moreover, this is feature of cells in the media with both low and high osmolality [12, 26]. Thus, in the first case, the cells are affected by hypotonic stress (HS), and in the second they are done by hypertonic shock (HSh).

The resulted effect of HSh on erythrocytes is developing the hypertonic hemolysis, which is part of the research area of cryobiologists, because at low temperature preservation in a free water freezing-out a strong concentration rise in extracellular medium occurs [10, 13]. The study of erythrocyte damage under HSh conditions is necessary to develop the ways of increasing their stability in cryopreservation.

The state of the cells exposed to extreme factors [18–20] is assessed with the parameter of osmotic fragility, *i. e.* by the concentration of hypotonic sodium chloride solution at which hemolysis of erythrocytes makes 50%. In addition, HS is used to diagnose the functional disorders of the circulatory system and assess the state of erythrocytes [16, 22], as well as in the case of their targeted drug load [11, 32].

Based on the above the study of the causes, patterns, mechanisms of hypotonic and hypertonic lysis of human erythrocytes is important for basic and applied research.

To elucidate the mechanisms of human erythrocyte resistance to the influence of stress factors, the approach associated with the targeted modification of various structural and functional components is widely used. Such a modification is not highly specific and can affect the cell as a whole, *i. e.* to some extent disrupt its nativeness. In this regard, the use of native erythrocytes of different mammalian species to investigate the osmotic sensitivity of cells is advisable. These cells differ in the composition of the cytoplasm and membrane, ability to deform, activity of transport pathways [2, 7, 9, 17]. Studies of the osmotic stability of mammalian erythrocytes will determine the features and patterns of its manifestation. Correlation analysis to assess the relationship strength between osmotic parameters and characteristics (size, composition of the cytoplasm and membrane) of erythrocytes of different mammalian species will enable us to approach the understanding of the mechanisms of cell osmotic sensitivity.

The research aim was to investigate the effects of hypertonic shock and hypotonic stress on erythrocytes of different mammalian species (human, bull, horse, rabbit, dog, rat) as well as to assess a possible correlation between an osmotic stability and structural and functional characteristics of mammalian erythrocytes.



еритроцити різних видів ссавців (людина, бик, кінь, кролик, собака, щур) і оцінка можливої кореляції між показниками осмотичної стійкості та структурно-функціональними характеристиками еритроцитів ссавців.

Матеріали та методи

У роботі використовували еритроцити, які були отримані з донорської крові людини, бика, коня, собаки, кролика і щура, заготовленої на гемоконсерванті «Глюгіцир» («Біофарма», Україна). Кров ссавців чоловічої статі застосовували для виключення впливу гормонів оваріального циклу. Кров чоловіків А (II)⁺ групи була надана Харківським обласним центром служби крові; кролика і щура – віварієм Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків). Експерименти проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447–IV від 21.02.2006 р.) із дотриманням вимог Комітету з біоетики Інституту, узгоджених із положенням «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986). Усі експерименти з застосуванням наданої Харківською державною зооветеринарною академією крові бика, коня і собаки проводили з дотриманням вимог Комітету з біоетики Академії. Об'єм взятої для аналізів крові з етичних міркувань був мінімальним, проте достатнім для забезпечення відтворюваних і значущих результатів.

Після видалення плазми еритромасу тричі відмивали шляхом центрифугування при 1000g протягом 3 хв в 10-кратному об'ємі фізіологічного розчину (0,15 моль/л NaCl; 0,01 моль/л фосфатного буфера, рН 7,4). Лейкоцитарну плівку і супернатант видаляли аспірацією. Еритроцити зберігали у вигляді щільного осаду не більше 4 годин при температурі 0°C. Усі використовувані в роботі середовища готували на 0,01 моль/л фосфатному буфері (рН 7,4).

Гіпертонічний шок еритроцитів ссавців здійснювали перенесенням 50 мкл вихідної суспензії клітин в 1,0 мл розчину NaCl (1,0–4,0 моль/л) при температурі 37°C із подальшою інкубацією протягом 5 хв. Кінцевий гематокрит – 0,4%.

Гіпотонічний стрес еритроцитів здійснювали внесенням аліквоти вихідної суспензії клітин (50 мкл) у 1,0 мл розчину NaCl (40–120 ммоль/л) при температурі 37°C на 5 хв. Кінцевий гематокрит – 0,4%.

Клітини осаджували центрифугуванням протягом 3 хв при 1000g. Вміст гемоглобіну, який вийшов в супернатант, визначали на спектрофо-

Materials and methods

Erythrocytes obtained from the donated human, bull, horse, dog, rabbit and rat blood procured with the hemopreservative Glugicurum (Biopharma, Ukraine) were used. Mammalian blood of males was used to exclude the effect of ovarian cycle hormones. Blood of men of A (II) + group was provided by the Kharkiv Regional Blood Service Center, the blood of bull, horse and dog was procured by the Research Unit at Kharkiv State Zooveterinary Academy, those of rabbit and rat were obtained at the Animal House Facility of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv). The experiments were performed in accordance with the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty' (№ 3447-IV, dated of February 21st, 2006) in compliance with the requirements of the Bioethics Committee of the Institute, consistent with the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used in Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986). All the experiments with blood of bull, horse and dog, which was provided by the Kharkiv State Zooveterinary Academy, were performed with keeping the requirements of the Committee in Bioethics of the Academy. The blood volume taken for analysis was minimal from the point of view of ethics, but sufficient for reproducing and significance of the results.

After plasma removal, the erythrocyte mass was thrice washed by centrifugation at 1000 g for 3 min in 10-fold volume of saline (0.15 mol/L NaCl; 0.01 mol/L phosphate buffer, pH 7.4). The leukocyte film and supernatant were removed by aspiration. Erythrocytes were stored as a dense precipitate for no longer than 4 hours at 0°C. All the media used in the research were prepared with 0.01 mol/L phosphate buffer (pH 7.4).

Hypertonic shock of mammalian erythrocytes was performed by transferring 50 µl of the initial cell suspension in 1.0 ml of NaCl solution (1.0–4.0 mol/L) at a temperature of 37°C, followed by incubation for 5 min. The final hematocrit is 0.4%.

Hypotonic stress of erythrocytes was initiated by adding an aliquot of the initial cell suspension (50 µl) into 1.0 ml of NaCl solution (40–120 µmol/L) at 37°C for 5 min. The final hematocrit made 0.4%.

Cells were pelleted by centrifugation for 3 min at 1000g. The supernatant hemoglobin content was determined by means of a SF-4A spectrophotometer (LOMO, Russia) with a flow cell at a wavelength of 543 nm and expressed as a percentage relative to 100% hemolysis of erythrocytes. The absorption of the sample was assumed as 100%,



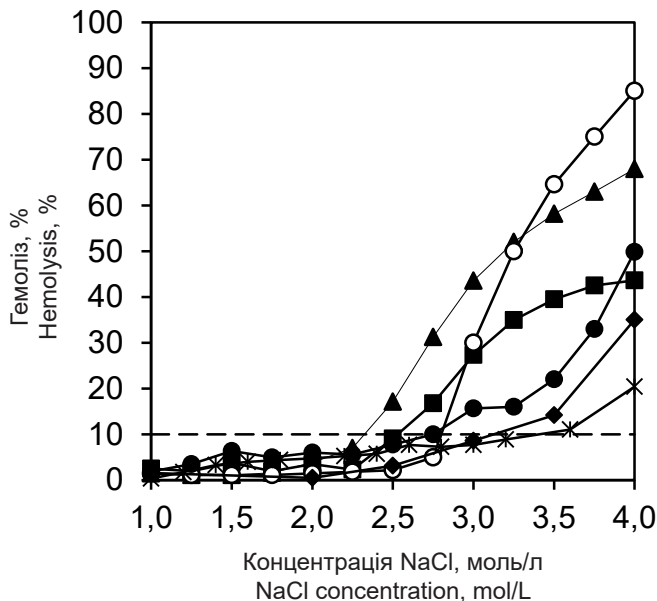


Рис. 1. Залежність рівня гемолізу від концентрації NaCl за умов гіпертонічного шоку еритроцитів ссавців (тривалість інкубування 5 хв): ▲ – бик, ■ – кінь, ○ – людина, ● – собака, ◆ – щур, × – кролик; пунктирна лінія – 10%-й рівень гемолізу.

Fig. 1. Dependence of hemolysis level on NaCl concentration in hypertonic shock of mammalian erythrocytes (5mins' incubation duration): ▲ – bull; ■ – horse, ○ – human being, ● – dog, ◆ – rat, × – rabbit; dotted line – 10% hemolysis rate.

тометрі СФ-4А («ЛОМО», Росія) з проточною кюветою при довжині хвилі 543 нм і виражали в процентах по відношенню до 100%-го гемолізу еритроцитів. За 100% приймали поглинання проби, в яку додавали тритон X-100 у концентрації 0,1%.

Осмоляльність розчинів визначали за допомогою осмометра ОМКА 1Ц-01 («Медлабортехніка», Україна).

Кореляційний аналіз із використанням непараметричного коефіцієнта рангової кореляції Спірмена (r_s) застосовували для аналізу зв'язків між досліджуваними показниками. Силу кореляційного зв'язку оцінювали як слабку при значеннях $r_s \leq 0,25$, помірну при $0,25 < r_s < 0,75$ і сильну при $r_s \geq 0,75$. Для малих вибірок прийнято відбирати сильні кореляції на підставі рівня статистичної значущості. Результати вважали не випадковими і значущими при $p \leq 0,05$.

Результати та обговорення

Для вивчення дії ГШ на еритроцити різних видів ссавців клітини переносили в середовища, які містять різні концентрації NaCl при 37°C (рис. 1). Пороговою називається максимальна концентрація сольового розчину (NaCl), в якому рівень гемолізу еритроцитів не перевищує 10%. За цим показником найбільш стійкими вияви-

то which triton X-100 was added at a concentration of 0.1%.

The osmolality of the solutions was determined using an OMKA 1C-01 osmometer (Medlabortekhnika, Ukraine).

Correlation analysis using the nonparametric Spearman's rank correlation coefficient (r_s) was applied to analyze the relationships between the studied indices. The correlation strength was estimated to be weak at $r_s \leq 0.25$, moderate at $0.25 < r_s < 0.75$, and strong at $r_s \geq 0.75$. For small samples, the strong correlations based on statistical significance are usually selected. The results were considered non-random and significant at $p \leq 0.05$.

Results and discussion

To study the effect of HSh on erythrocytes of different mammalian species, the cells were transferred to the media containing various concentrations of NaCl at 37°C (Fig. 1). The threshold is the maximum concentration of saline (NaCl), in which the hemolysis rate of erythrocytes does not exceed 10%. According to this index, the most stable were rabbit erythrocytes, the bull cells were the least ones (Fig. 2).

Increasing the salt concentration in the media above the threshold leads to the development of varying degrees of hypertonic hemolysis of mammalian cells. Comparison of the hemolysis values for

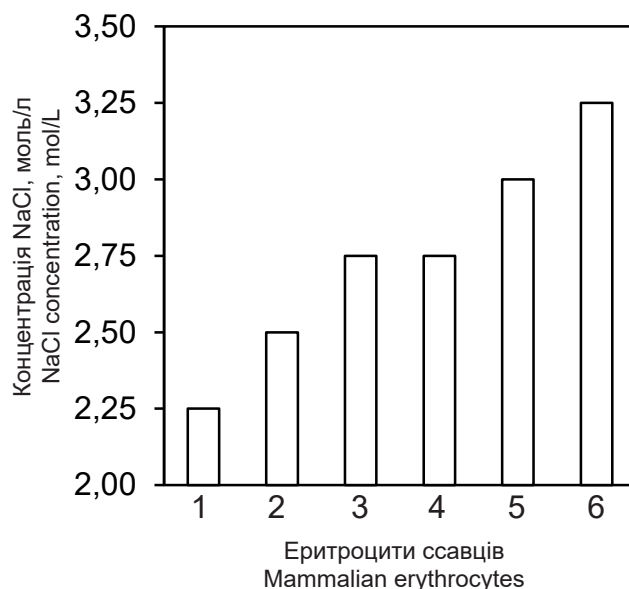


Рис. 2. Значення порогових концентрацій NaCl за умов гіпертонічного шоку еритроцитів ссавців (тривалість інкубування 5 хв): 1 – бик, 2 – кінь, 3 – людина, 4 – собака, 5 – щур, 6 – кролик.

Fig. 2. Threshold values of NaCl concentrations in hypertonic shock of mammalian erythrocytes (5mins' incubation duration): 1 – bull; 2 – horse, 3 – human being, 4 – dog, 5 – rat, 6 – rabbit.



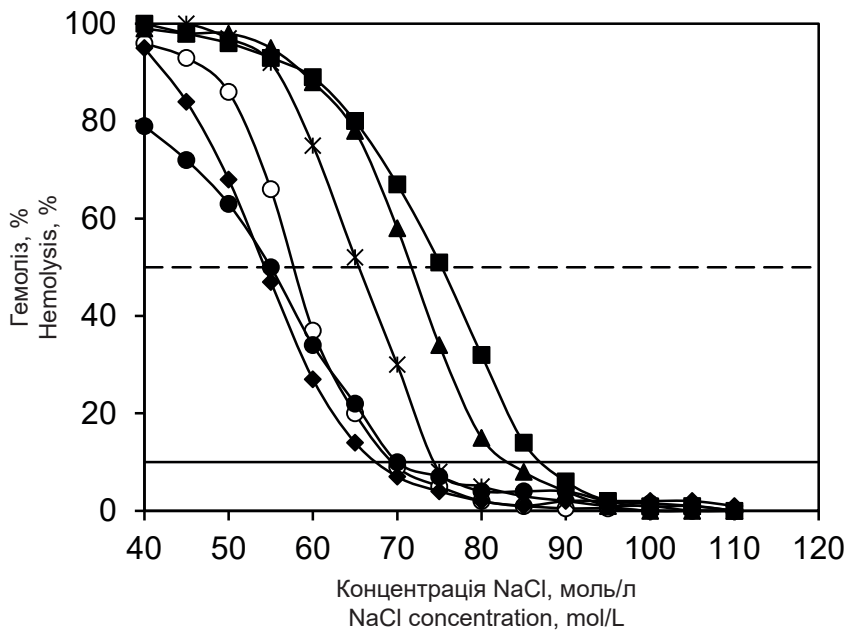


Рис. 3. Гіпотонічний гемоліз еритроцитів ссавців (тривалість інкубування 5 хв): ▲ – бик, ■ – кінь, ○ – людина, ● – собака, ◆ – щур, × – кролик; пунктирна лінія – 10%-й рівень гемолізу; пряма лінія – 50%-й рівень гемолізу.

Fig. 3. Hypotonic hemolysis of mammalian erythrocytes (5mins' incubation duration): ▲ – bull; ■ – horse, ○ – human being, ● – dog, ◆ – rat, × – rabbit; dotted line – 10% hemolysis rate; straight line – 50% hemolysis rate.

лися еритроцити кролика, найменш стійкими – клітини бика (рис. 2).

Збільшення концентрації солі у середовищі вище за порогову призводить до розвитку різного ступеня гіпертонічного гемолізу клітин ссавців. Порівняння значень гемолізу еритроцитів ссавців у висококонцентрованому сольовому середовищі (4,0 моль/л NaCl) (див. рис. 1) показало більш високу гіпертонічну чутливість еритроцитів людини, ніж клітин тварин. За вказаним показником найбільш стійкими до гіпертонічних розчинів були еритроцити кролика.

На рис. 3 представлено залежності гіпотонічного гемолізу еритроцитів ссавців від концентрації NaCl у середовищі. В цілому характер залежностей для еритроцитів усіх ссавців подібний, проте існують і деякі видові відмінності. Гіпотонічну чутливість еритроцитів можна оцінювати за двома критеріями: пороговою концентрацією NaCl та індексом осмотичної крихкості (концентрація NaCl, за якої реєструється 50%-й гемоліз).

Аналіз гіпотонічної чутливості еритроцитів ссавців за вказаними критеріями показав, що конячі та бичачі еритроцити, які починають лізувати і досягають 50%-го рівня гемолізу в середовищах із більш високими концентраціями NaCl, більш чутливі до дії ГС, а більш стійкі – клітини людини, собаки, щура (рис. 3).

Результати вивчення ГС і ГШ еритроцитів

mammalian erythrocytes in a highly concentrated saline (4.0 mol/L NaCl) (see Fig. 1) showed a higher hypertonic sensitivity of human erythrocytes versus animal cells. According to this index, the rabbit erythrocytes were the most resistant to hypertonic solutions.

Figure 3 shows the dependence of hypotonic hemolysis of mammalian erythrocytes on NaCl concentration in the medium. In general, the nature of the dependences for erythrocytes of all mammals is similar, but there are some species differences. Hypotonic sensitivity of erythrocytes can be assessed by two criteria: the threshold concentration of NaCl and the osmotic fragility index (NaCl concentration at which 50% hemolysis is registered).

Analysis of the hypotonic sensitivity of mammalian erythrocytes according to these criteria demonstrated that equine and bovine erythrocytes, which begin to lyse and reach 50% hemolysis in the media with higher NaCl concentrations, are more sensitive to HS, and human, dog, rat cells are more stable (Fig. 3).

The findings on HS and HSh of mammalian erythrocytes indicate different cell sensitivity to these types of stress, as well as various responses to a certain stress. A comparative analysis of the response of erythrocytes of different mammalian species to a sharp change in the medium tonicity (see Figs. 1–3) revealed that mammalian erythrocytes, which are more sensitive to the action of HS, have higher resistance in HS conditions.

Based on the above, it would appear reasonable to assume that the different sensitivity of mammalian erythrocytes to the effect of HS and HSh is related to their structural and functional features. Erythrocytes of various mammalian species are quite conservative in their structure, but they differ in cytoplasmic composition, ability to deform, activity of transport pathways, phospholipid and protein composition of membrane [2, 7, 9, 15, 17].

Correlation analysis was used to evaluate the relationship between osmotic sensitivity and structural and functional characteristics of erythrocytes derived from different mammalian species. The purpose of this analysis is to establish the direction (positive or negative) and strength of the relation-

сравців свідчать про різну чутливість клітин до дії цих видів стресу, а також про неоднакову реакцію на певний стрес. Порівняльний аналіз реакції еритроцитів різних видів ссавців на різку зміну тоничності середовища (див. рис. 1–3) виявив, що за умов ГШ еритроцити ссавців, які більш чутливі до дії ГС, мають більшу стійкість.

Виходячи з вищевикладеного природно припустити, що різна чутливість еритроцитів ссавців до дії ГС і ГШ пов'язана з їх структурно-функціональними особливостями. Еритроцити різних видів ссавців за своєю будовою досить консервативні, проте вони відрізняються за складом цитоплазми, здатністю до деформації, активністю транспортних шляхів, фосфоліпідним і білковим складом мембрани [7, 12, 14, 18, 20].

За допомогою кореляційного аналізу оцінювали взаємозв'язок між показниками осмотичної чутливості та структурно-функціональними характеристиками еритроцитів різних видів ссавців. Задача даного аналізу полягає у встановленні напрямку (позитивний чи негативний) і сили зв'язку між ознаками, які варіюють, і, нарешті, в перевірці рівня значущості отриманих коефіцієнтів кореляції. Оскільки розподіл отриманих даних часто істотно відрізнявся від нормального розподілу, для кореляційного аналізу був використаний коефіцієнт рангової кореляції Спірмена [4].

У даному контексті термін «зв'язок» означає будь-які узгоджені зміни, які можуть пояснюватися багатьма причинами. Кореляційні зв'язки не можуть розглядатися як причинно-наслідковий зв'язок, вони свідчать лише про те, що зміна однієї ознаки, як правило, супроводжується певною зміною іншої.

У роботі реперними точками дії ГС на еритроцити ссавців були значення порогових концентрацій NaCl та індекси осмотичної крихкості (див. рис. 3), а впливу ГШ – порогові концентрації NaCl і рівень гемолізу в 4,0 моль/л розчині NaCl (див. рис. 1, 2).

Структурно-функціональні характеристики досліджуваних еритроцитів можна умовно розділити на чотири групи: геометричні (розмір), цитоплазматичні (вміст одно- і двовалентних катіонів, АТФ, води, гемоглобіну і його гідрофобність), мембранні (ліпідний склад і білки цитоскелета), функціональні (швидкість трансмембранного водного транспорту в еритроцитах).

Кореляційний аналіз показав наявність слабких, помірних і сильних зв'язків між показниками осмотичної стійкості еритроцитів різних видів ссавців і структурно-функціональними

ship between the features that vary, and finally to verify the level of significance of the obtained correlation coefficients. Because the distribution of the obtained data often differed significantly from the normal distribution, the Spearman's rank correlation coefficient was used for correlation analysis [27].

In this context, the term 'relationship' means any coordinated change that may be stipulated by many reasons. Correlation relationships cannot be considered as a causal relationship, they only indicate that a change in one trait is usually accompanied by the one in another.

In the research, the reference points of the HS effect on mammalian erythrocytes were the values of NaCl thresholds and osmotic fragility indices (see Fig. 3), and for the influence of HSh these were threshold NaCl concentrations and hemolysis in 4.0 mol/L NaCl solution (see Fig. 1, 2).

Structural and functional characteristics of the studied erythrocytes can be divided into four groups: geometric (size), cytoplasmic (content of monovalent and divalent cations, ATP, water, hemoglobin and its hydrophobicity), membrane (lipid composition and cytoskeletal proteins), functional water transport in erythrocytes).

Correlation analysis revealed weak, moderate, and strong correlations between the osmotic stability of erythrocytes of different mammalian species and structural and functional characteristics of cells. In this work only statistically significant strong relationships are presented.

Among the identified correlations between the indices of hypotonic hemolysis of mammalian erythrocytes and their structural and functional characteristics (geometric, cytoplasmic, membrane and functional), strong statistically significant relationships were found only for a cell size, in particular their diameter (Fig. 4).

There is quite enough published reports on the size of mammalian erythrocytes, especially in humans [1, 6, 8, 21]. Despite the supposed availability of these results, the difficulty of their use consists in their wide variation, as they were obtained under different conditions and various methods.

N.K. Komarov *et al.* [14] by light scattering determined the size of erythrocytes of a large group of mammals, which allowed to use these data to establish the strength of the correlation between the osmotic and geometric characteristics of mammalian erythrocytes (Fig. 4). It is apparent that the threshold concentrations of NaCl and the value of the osmotic fragility index in hypotonic hemolysis of mammalian erythrocytes (human, bull, rabbit, rat, horse, dog) are negatively correlated



характеристиками клітин. У роботі представлено тільки статистично значущі сильні зв'язки.

З виявлених кореляційних зв'язків між показниками гіпотонічного гемолізу еритроцитів ссавців та їх структурно-функціональними характеристиками (геометричні, цитоплазматичні, мембранні та функціональні) сильні статистично значущі зв'язки встановлено тільки для розмірів клітин, зокрема їх діаметра (рис. 4).

У літературних джерелах представлено достатньо інформації щодо розмірів еритроцитів ссавців, особливо людини [6, 11, 13, 24]. Незважаючи на гадану доступність цих результатів, складність їх використання полягає в широкій варіації, оскільки вони були отримані за різних умов і методів.

Н.К. Комаров та співавт. [2] методом світлорозсіювання визначили розміри еритроцитів великої групи ссавців, що дозволило використовувати зазначені дані з метою встановлення сили кореляційного зв'язку між осмотичними і геометричними характеристиками еритроцитів ссавців (рис. 4). Видно, що порогові концентрації NaCl і значення індексу осмотичної крихкості за гіпотонічного гемолізу еритроцитів ссавців (людина, бик, кролик, щур, кінь, собака) негативно корелюють із діаметром клітини ($r_s = -0,955$, $p = 0,005$ та $r_s = -0,975$, $p = 0,005$ відповідно). Так, більш високі значення порогових концентрацій NaCl та індексу осмотичної крихкості за умов ГС мають невеликі клітини.

У разі ГШ еритроцитів ссавців кореляційний аналіз сили зв'язку між показниками гіпертонічного гемолізу і структурно-функціональними характеристиками клітин – геометричними, цитоплазматичними, мембранними та функціональними – дозволив встановити сильні статистично значущі зв'язки тільки для останніх.

Головну роль у розвитку гіпертонічного пошкодження клітини відіграє проникність мембрани еритроцита для молекул води. Висока водна проникність забезпечує швидкий відтік води з клітини в момент її внесення в гіпертонічне середовище, що зменшує осмотичне навантаження на клітину і, як наслідок, знижує пошкоджуючу дію гіпертонічного розчину.

Позитивний сильний кореляційний зв'язок встановлено між коефіцієнтом трансмембранної дифузії води еритроцитів ссавців [8–10] і пороговими концентраціями NaCl за умов дії ГШ на клітини ($r_s = 0,928$, $p = 0,008$) (рис. 5).

Для еритроцитів характерна висока водна проникність, яка обумовлена наявністю в їх

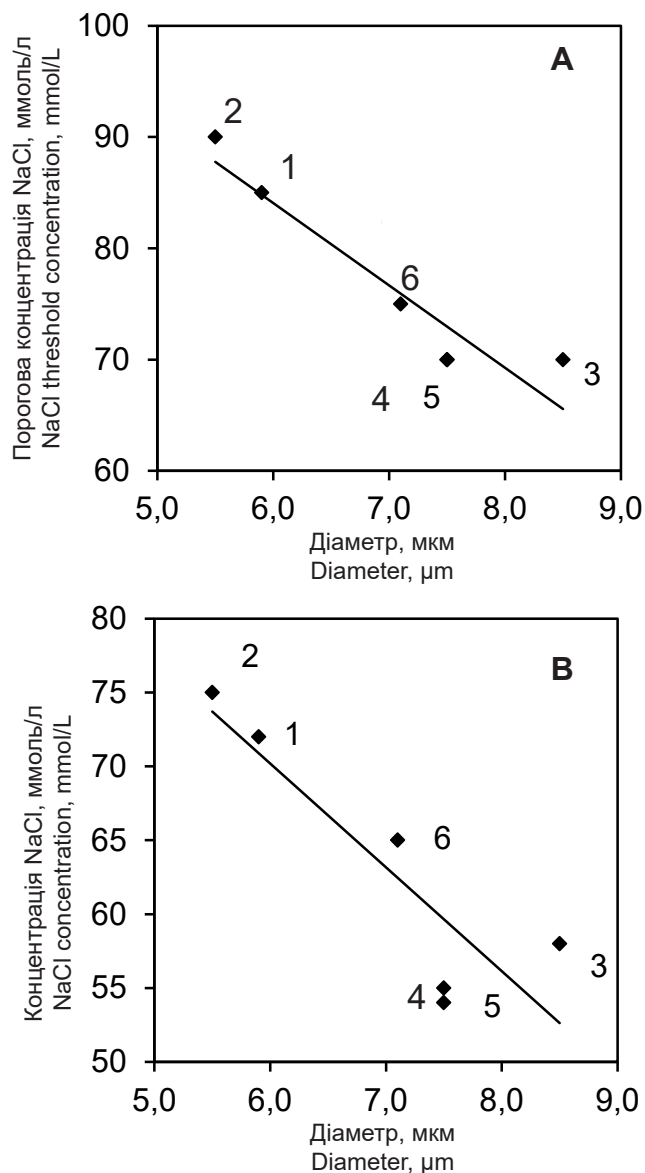


Рис. 4. Взаємозв'язок між значеннями діаметра еритроцитів ссавців і величинами порогової концентрації NaCl ($r_s = -0,955$, $p = 0,005$) (A), індексом осмотичної крихкості ($r_s = -0,975$, $p = 0,005$) (B) за умов гіпотонічного гемолізу еритроцитів ссавців: 1 – бик, 2 – кінь, 3 – людина, 4 – собака, 5 – щур, 6 – кролик.

Fig. 4. Relationship between diameter of mammalian erythrocytes and threshold values of NaCl ($r_s = -0,955$, $p = 0,005$) (A), osmotic fragility ($r_s = -0,975$, $p = 0,005$) (B) in hypotonic hemolysis of mammalian erythrocytes: 1 – bull, 2 – horse, 3 – human being, 4 – dog, 5 – rat, 6 – rabbit.

with cell diameter ($r_s = -0.955$, $p = 0.005$ and $r_s = -0.975$, $p = 0.005$, respectively). Thus, small cells have higher NaCl threshold concentrations and osmotic fragility index at HS.

In HSh of mammalian erythrocyte the correlation analysis of the relationship strength between hypertensive hemolysis and structural and functional characteristics of cells, *i. e.* geometric, cytoplasmic, membrane and functional, allowed

мембранах аквапоринів [29]. Інгібітором цих білкових каналів виступає РСМБС, внаслідок дії якого відбувається закриття білкових водних каналів у мембрані [33]. Отже, наведена в таблиці величина ΔP_d (різниця між значеннями дифузійної водної проникності контрольних клітин та еритроцитів, оброблених інгібітором водного транспорту РСМБС) практично відображає активність білкових водних каналів.

Високі значення ΔP_d для еритроцитів щура, кролика і собаки (таблиця) свідчать про важливу роль білкових каналів у мембранному транспорті води. Результати порівняльного електрофоретичного дослідження білкового компонента еритроцитарних мембран людини, коня, кролика, бика і щура показали, що вміст білка смуги 4.5, який відповідає глікозилізованій формі аквапорину I, вищий у еритроцитній мембрані кролика і щура порівняно з мембранами клітин людини і бика [20]. У той самий час в еритроцитах цих тварин відзначається присутність також неглікозилізованої форми аквапорину (7+ post7).

Водний транспорт, обумовлений активністю білкових водних каналів, максимально виражений у еритроцитах кролика (таблиця). Це може бути пов'язано з високою активністю і/або великою кількістю водних каналів в їх мембранах (мінімум 5×10^5 копій водних каналів на еритроцит [28]). Крім того, серед клітин усіх досліджуваних ссавців саме еритроцити кролика характеризуються максимальним ступенем інгібування водного транспорту за використання РСМБС (73% проти 46–70% для еритроцитів інших ссавців) (таблиця) [8–10].

Дані рис. 5 і 6 свідчать про значну кореляцію між показниками гіпертонічного гемолізу еритроцитів ссавців (порогові концентрації NaCl і гемоліз у 4,0 моль/л NaCl) і величиною ΔP_d ($r_s = 0,899$, $p = 0,015$ і $r_s = -0,886$, $p = 0,019$ відповідно). Так, клітини з високим значенням водного транспорту, зумовленого роботою білкових каналів, починають гемолізувати в більш кон-

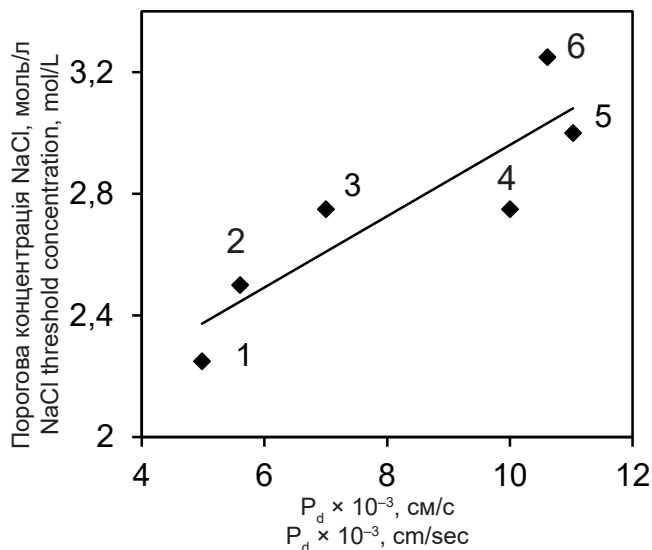


Рис. 5. Взаємозв'язок між коефіцієнтом дифузійного водного транспорту (P_d) еритроцитів і пороговими концентраціями NaCl за умов гіпертонічного гемолізу еритроцитів ссавців ($r_s = 0,928$, $p = 0,008$): 1 – бик, 2 – кінь, 3 – людина 4 – собака, 5 – щур, 6 – кролик.

Fig. 5. Relationship between diffusion water transport coefficient (P_d) of erythrocytes and threshold values of NaCl, osmotic fragility in hypertonic hemolysis of mammalian erythrocytes ($r_s = 0,928$, $p = 0,008$): 1 – bull, 2 – horse, 3 – human being, 4 – dog, 5 – rat, 6 – rabbit.

the establishing of strong statistically significant relationships only for the latter.

The main role in development of hypertonic cell damage is played by the permeability of erythrocyte membrane to water molecules. High water permeability provides a rapid outflow of water from the cell at the time of its introduction into hypertonic medium, which reduces an osmotic load on a cell and, as a consequence, diminishes the damaging effect of hypertonic solution.

A positive strong correlation was found between the coefficient of transmembrane water diffusion of mammalian erythrocytes [3–5] and the threshold concentrations of NaCl under the influence of HSh on cells ($r_s = 0.928$, $p = 0.008$) (Fig. 5).

Дифузійна водна проникність мембран еритроцитів різних видів ссавців
Diffusive permeability of water of erythrocyte membranes in different mammalian species

Показники Indices	Щур [8] (3) Rat [8] (3)	Бик [8] (3) Bull [8] (3)	Людина [8] (3) Human being [8] (3)	Кролик [8] (3) Rabbit [8] (3)	Собака [9] (4) Dog [9] (4)	Кінь [10] (5) Horse [10] (5)
$P_d \times 10^{-5}$, м/с	11,03	4,98	7,00	10,61	10,00	5,60
$P_{d \text{ РСМБС}} \times 10^{-5}$, м/с	3,70	2,69	3,63	2,89	3,00	2,00
$\Delta P_d = (P_d - P_{d \text{ РСМБС}}) \times 10^{-5}$, м/с	7,33	2,29	3,37	7,72	7,00	3,60

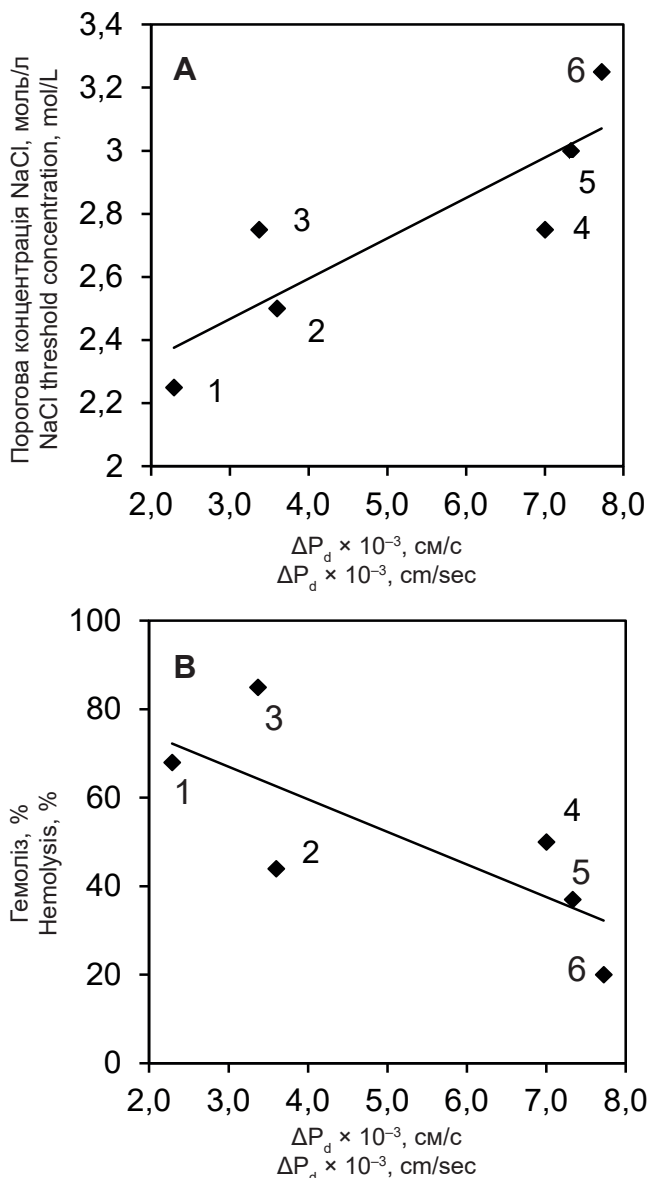


Рис. 6. Взаємозв'язок між коефіцієнтом дифузійного водного транспорту еритроцитів ссавців, який інгібується PCMBs (ΔP_d), і пороговими концентраціями NaCl ($r_s = 0,899$, $p = 0,015$) (A), рівнем гемолізу в розчині 4,0 моль/л NaCl ($r_s = -0,886$, $p = 0,019$) (B) за умов гіпертонічного гемолізу еритроцитів ссавців: 1 – бик, 2 – кінь, 3 – людина, 4 – собака, 5 – щур, 6 – кролик.

Fig. 6. Relationship between diffusion water transport coefficient (P_d) of mammalian erythrocytes, which is inhibited by PCMBs (ΔP_d), and threshold values of NaCl ($r_s = 0,899$, $p = 0,015$) (A), osmotic fragility ($r_s = -0,886$, $p = 0,019$) (B) in hypertonic hemolysis of mammalian erythrocytes: 1 – bull; 2 – horse, 3 – human being, 4 – dog, 5 – rat, 6 – rabbit.

центрованих сольових середовищах (див. рис. 5) і характеризуються нижчим рівнем гемолітичного пошкодження в висококонцентрованому сольовому розчині (див. рис. 6). Таким чином, мембрана еритроцитів ссавців, яка має високе значення ΔP_d (величина, що відображає роботу білкових водних каналів), більш стійка до дії ГШ.

Erythrocytes are characterized with a high water permeability, stipulated by the presence of aquaporins in their membranes [29]. PCMBs inhibits these protein channels and its effect results in the closure of protein water channels in membrane [33]. Therefore, the ΔP_d value presented in the Table (difference between the diffusion water permeability of control cells and erythrocytes treated with the water transport inhibitor PCMBs) virtually reflects the activity of protein water channels.

High ΔP_d values for erythrocytes of rat, rabbit and dog (Table) indicate an important role of protein channels in membrane water transport. The results of a comparative electrophoretic study of the protein component of human, horse, rabbit, bull and rat erythrocyte membranes showed that the protein content of band 4.5, which corresponds to the glycosylated aquaporin I, is higher in the rabbit and rat erythrocyte membrane if compared with human and bull cell membranes [17]. At the same time in erythrocytes of these animals the presence and non-glycosylated aquaporin (7 + post7) is noted.

Water transport driven by the activity of protein water channels is the most pronounced in the rabbit erythrocytes (Table). This may be due to a high activity and / or a large number of water channels in their membranes (minimum 5×10^5 copies of water channels per erythrocyte [28]). In addition, among the cells of all the studied mammals, the rabbit erythrocytes are characterized with the maximum inhibition of water transport using PCMBs (73% vs. 46–70% for erythrocytes of other mammals) (Table) [3–5]. The data of Fig. 5 and 6 indicate a significant correlation between the rates of hypertonic hemolysis of mammalian erythrocytes (threshold concentrations of NaCl and hemolysis of 4.0 mol/L NaCl) and the ΔP_d value ($r_s = 0.899$, $p = 0.015$ and $r_s = -0.886$, $p = 0.019$, respectively). Thus, the cells with a high water transport value due to the work of protein channels begin to hemolyze in more concentrated salines (see Fig. 5) and are characterized with a lower hemolytic damage in highly concentrated saline (see Fig. 6). Thus, the membrane of mammalian erythrocytes, which has a high ΔP_d value, (the one reflecting the work of protein water channels), is more resistant to HSh.

The results of the analysis of the correlations strength and direction indicate that higher threshold salt concentrations in the HSh of mammalian erythrocytes have the cells with higher diffusion permeability to water (see Fig. 5) and high activity of protein water channels. Fig. 6A). These cells possess a low hemolysis rate in 4.0 mol/L NaCl (see Fig. 6B).



Результати аналізу сили і напряму кореляційних зв'язків свідчать про те, що більш високі величини порогових концентрацій солі за умов ГШ еритроцитів ссавців мають клітини з більш високою дифузійною проникністю для води (див. рис. 5) і високою активністю білкових водних каналів (див. рис. 6, А). Ці клітини мають невисокий рівень гемолізу в 4,0 моль/л NaCl (див. рис. 6, В).

У момент внесення еритроцитів у гіпертонічне середовище відбувається вихід води з клітин. Зневоднення еритроцитів супроводжується сильним їх стисненням і значною деформацією плазматичної мембрани [1], в результаті зароджуються трансмембранні дефекти, які миттєво сягають розміру гемолітичної пори. Оскільки гіпертонічне пошкодження клітин виражено меншою мірою в випадку дуже швидкого їх зневоднення, можна вважати, що гемоліз еритроцитів відбувається в нерівноважних умовах виходу з них води. Швидке завершення виходу внутрішньоклітинної води є сприятливішим для клітин, оскільки скорочується час формування та еволюції трансмембранної пори.

У гіпотонічному середовищі еритроцити піддаються гемолізу, оскільки в результаті входу води відбувається їх набухання. Одне з уявлень розвитку гіпотонічного пошкодження еритроцитів ґрунтується на тому, що для лізису клітин необхідні досить малі часові проміжки. Дійсно еритроцитарні мембрани характеризуються високою проникністю для води [7, 18, 30], тому саме транспорт води визначає швидкість наростання в мембранах розтягуючих тангенціальних напружень і, отже, момент їх розриву, тобто гемоліз [3, 26]. Згідно з іншими уявленнями, заснованими на мікроскопічних спостереженнях, час для розвитку гемолітичного процесу в гіпотонічних середовищах безпосередньо не пов'язаний з часом досягнення клітинами об'єму, при якому починається гемоліз [27]. Вихід гемоглобіну з еритроцитів відбувається не миттєво, а протягом певного часового інтервалу. Оскільки за умов ГС еритроцитів ссавців нами не було виявлено сильного кореляційного зв'язку між характеристиками водного транспорту і показниками осмотичної стійкості клітин, можна допустити, що на формування мембранної макроскопічної пори впливають деякі структурно-функціональні особливості еритроцитів, які в нашій роботі не досліджувалися.

Висновки

Отже, оцінка зв'язку показників осмотичної стійкості еритроцитів людини, бика, кроли-

At the time of introduction of erythrocytes into hypertonic medium there is a release of water from the cells. Dehydration of erythrocytes is accompanied with their strong compression and significant deformation of plasma membrane [13], resulting in the emergence of transmembrane defects, which instantly reach the size of the hemolytic pore. Because hypertonic damage of a cell is less pronounced in very rapid dehydration, the hemolysis of erythrocytes can be assumed to occur in non-equilibrium conditions of water out of them. The faster the release of intracellular water is completed, the more this is favorable for the cells due to the reduction of the time of formation and evolution of the transmembrane pore.

In a hypotonic medium the erythrocytes undergo hemolysis because their swelling resulted from the water entry. One of the ideas of developing hypotonic erythrocyte damage is based on the fact that the lysis of cells requires very short time intervals. Indeed, the erythrocyte membranes are characterized by high permeability to water [2, 15, 30], so it is water transport that determines the rate of increase in membranes of tensile tangential stresses and, consequently, the moment of their rupture, *i. e.* hemolysis [24, 23]. According to another view based on microscopic observations, the time for the hemolytic process development in hypotonic media is not directly related to the time the cells reach the volume at which hemolysis begins [25]. The release of hemoglobin from erythrocytes is not instantaneous, but it proceeds over a period of time. Since we did not find a strong correlation between the water transport and osmotic stability of cells in mammalian erythrocytes, we can assume that the formation of membrane macroscopic pores is influenced by some structural and functional features of erythrocytes (not investigated here).

Conclusions

Therefore, the evaluation of the relationship between the osmotic stability of human, bull, rabbit, rat, horse and dog erythrocytes with the structural and functional characteristics of these cells demonstrated a correlation between cell resistance to HS with their size (diameter) and cell resistance to HSh with erythrocyte membrane permeability to water.

References

1. Abramowicz JS, Miller MW, Battaglia LF, Mazza S. Comparative hemolytic effectiveness of 1 MHz ultrasound on human and rabbit blood *in vitro*. *Ultrasound Med Biol.* 2003; 29(6): 867–73.



18. 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.
19. López de Frutos L, Cebolla JJ, Irún P, et al. The erythrocyte osmotic resistance test as screening tool for cholesterol-related lysosomal storage diseases. *Clin Chim Acta*. 2018; 480 (May): 161–5.
20. 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): 270–6.
21. Mineo H. Effects of carboxylic acids on osmotic resistance in rat and guinea pig red blood cells *in vitro*: the relationship between partition coefficient and changes in osmotic fragility. *Biochem Pharmacol (Los Angel)* [Интернет]. 2018; 7(245): 1–9 [Цитовано 16.10.2019]. Доступно на: <https://www.longdom.org/open-access/effects-of-carboxylic-acids-on-osmotic-resistance-in-rat-and-guinea-pig-red-blood-cells-in-vitro-the-relationship-between-partition-2167-0501-1000245.pdf>
22. Mineo H, Matsuda C, Suzuki Y, et al. Benzoic acid and its derivatives increase membrane resistance to osmotic pressure in isolated sheep erythrocytes. *Biochem Pharmacol (Los Angel)* [Интернет]. 2018; 7(260): 1–9 [Цитовано 16.10.2019]. Доступно на: <https://www.longdom.org/open-access/benzoic-acid-and-its-derivatives-increase-membrane-resistance-to-osmotic-pressure-in-isolated-sheep-erythrocytes-2167-0501-1000260.pdf>
23. Mineo H, Moriyoshi M. Carboxylic acids with certain molecular structures decrease osmotic fragility against osmotic pressure in cattle erythrocytes *in vitro*: appearance of a wedge-like effect similar to RBCs in other animal species. *Biochem Pharmacol (Los Angel)* [Интернет]. 2019; 8(264): 1–12 [Цитовано 16.10.2019]. Доступно на: https://mitsubishi-motors.com.ua/ua/model/eclipse-cross/?utm_source=UMH_Mens_Package&utm_medium=CatFish_100x150&utm_campaign=MMC_Eclipse_Cross_May-18
24. Nie Z, Cui F, Tzeng YK, et al. High-speed mass analysis of whole erythrocytes by charge-detection quadrupole ion trap mass spectrometry. *Anal Chem*. 2007; 79(19): 7401–7.
25. Orbach A, Zelig O, Yedgar S, Barshtein G. Biophysical and Biochemical Markers of Red Blood Cell Fragility. *Transfus Med Hemother*. 2017; 44(3):183–7.
26. Pajic-Lijakovic I. Erythrocytes under osmotic stress – modeling considerations. *Prog Biophys Mol Biol*. 2015; 117(1): 113–24.
27. Saari JT, Beck JS. Hypotonic hemolysis of human red blood cells: a two-phase process. *J Membr Biol*. 1975; 23(3–4): 213–26.
28. Solomon AK, Chasan B, Dix JA, et al. The aqueous pore in the red cell membrane: band 3 as a channel for anions, cations, non-electrolytes, and water. *Ann NY Acad Sci*. 1983; 414(1): 97–124.
29. Sugie J, Intaglietta M, Sung LA. Water transport and homeostasis as a major function of erythrocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018; 314(5): H1098–H1107.
30. Tsai S-T, Zhang R, Verkman AS. High Channel-mediated water permeability in rabbit erythrocytes: characterization in native cells and expression in *Xenopus* oocytes. *Biochemistry*. 1991; 30(8): 2087–92.
31. Yawata Y. *Cell Membrane: The Red Blood Cell as a Model*. Weinheim: WILEY-VCH; 2003. 448 p.
32. Yew NS, Dufour E, Przybylska M, et al. Erythrocytes encapsulated with phenylalanine hydroxylase exhibit improved pharmacokinetics and lowered plasma phenylalanine levels in normal mice. *Mol Genet Metab*. 2013; 109(4): 339–44.
33. Zeidel ML, Ambudkar SV, Smith BL, Agre P. Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein. *Biochemistry*. 1992; 31(33): 7436–40.
- resistance-to-osmotic-pressure-in-isolated-sheep-erythrocytes-2167-0501-1000260.pdf
20. Mineo H, Moriyoshi M. Carboxylic acids with certain molecular structures decrease osmotic fragility against osmotic pressure in cattle erythrocytes *in vitro*: appearance of a wedge-like effect similar to RBCs in other animal species. *Biochem Pharmacol (Los Angel)*. [Internet]. [cited 2019 Oct 16] 2019; 8(264): 1–12. Available from: https://mitsubishi-motors.com.ua/ua/model/eclipse-cross/?utm_source=UMH_Mens_Package&utm_medium=CatFish_100x150&utm_campaign=MMC_Eclipse_Cross_May-18
21. Nie Z, Cui F, Tzeng YK et al. High-speed mass analysis of whole erythrocytes by charge-detection quadrupole ion trap mass spectrometry. *Anal Chem*. 2007; 79(19): 7401–7.
22. Orbach A, Zelig O, Yedgar S, Barshtein G. Biophysical and Biochemical Markers of Red Blood Cell Fragility. *Transfus Med Hemother*. 2017; 44(3):183–7.
23. Pajic-Lijakovic I. Erythrocytes under osmotic stress - modeling considerations. *Prog Biophys Mol Biol*. 2015; 117(1): 113–24.
24. Petrenko YuM, Vladimirov YuA. [Change in erythrocyte size when swelling in hypoosmotic media]. *Biofizika*. 1987; 32(3): 448–53. Russian.
25. Saari JT, Beck JS. Hypotonic hemolysis of human red blood cells: a two-phase process. *J Membr Biol*. 1975; 23(3–4): 213–26.
26. Shpakova NM. Temperature and osmotic sensitivity of red blood cells of different mammalian species. *Animal Biology*. 2010; 12(1): 382–91.
27. Sidorenko EV. [Methods of mathematical processing in psychology]. St. Petersburg: Rech; 2003. 350 p. Russian.
28. Solomon AK, Chasan B, Dix JA et al. The aqueous pore in the red cell membrane: band 3 as a channel for anions, cations, non-electrolytes, and water. *Ann NY Acad Sci*. 1983; 414(1): 97–124.
29. Sugie J, Intaglietta M, Sung LA. Water transport and homeostasis as a major function of erythrocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018; 314(5): H1098–H1107.
30. Tsai S-T, Zhang R, Verkman AS. High Channel-mediated water permeability in rabbit erythrocytes: characterization in native cells and expression in *Xenopus* oocytes. *Biochemistry*. 1991; 30(8): 2087–92.
31. Yawata Y. *Cell Membrane: The Red Blood Cell as a Model*. Weinheim: WILEY-VCH; 2003. 448 p.
32. Yew NS, Dufour E, Przybylska M, et al. Erythrocytes encapsulated with phenylalanine hydroxylase exhibit improved pharmacokinetics and lowered plasma phenylalanine levels in normal mice. *Mol Genet Metab*. 2013; 109(4): 339–44.
33. Zeidel ML, Ambudkar SV, Smith BL, Agre P. Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein. *Biochemistry*. 1992; 31(33): 7436–40.

