

УДК 57.043:577.352.43:51-76

О.Ф. Тодрін, О.В. Тимофеева, О.І. Гордієнко\*

## Часові характеристики масоперенесення та трансмембранного потенціалу еритроцитів у процесі еквілібрації в розчинах кріопротекторів

UDC 57.043:577.352.43:51-76

O.F. Todrin, O.V. Timofeyeva, O.I. Gordiyenko\*

### Time-Dependent Features of Mass Transfer and Transmembrane Potential in Erythrocytes During Equilibration in Cryoprotective Solutions

**Реферат:** На підставі розробленої фізико-математичної моделі процесів масоперенесення, яка враховує трансмембранне перенесення неелектролітів, основних іонів та пов'язані з ним зміни трансмембранного потенціалу, досліджено перерозподіл осмотично активних речовин у процесі еквілібрації еритроцитів у розчинах кріопротекторів. Розраховано часові параметри зміни концентрацій осмотично активних речовин всередині та ззовні клітин, а також трансмембранного електричного потенціалу. Показано, що під час експозиції еритроцитів людини в 1М розчинах гліцерину (Гл.), 1,2-пропандіолу (1,2-ПД) і диметилсульфоксиду (ДМСО) знак їхнього трансмембранного електричного потенціалу змінюється тричі, а у розчинах етиленгліколю (ЕГ) і ацетаміду (АА) — один раз. Аналіз отриманих результатів показав, що найбільш прийнятною для подальшого кріоконсервування з точки зору досягнення еритроцитами, за комплексом показників, стану наближеного до рівноважного в 1М розчині Гл є їх еквілібрація протягом 5,5 хв, а в розчинах ДМСО, АА, ЕГ і 1,2-ПД з такою самою концентрацією — 1 хв. При цьому клітини залишаються дещо зневодненими (на 5,5–7,5%), а концентрації кріопротекторів всередині еритроцитів за тривалішої експозиції змінюються несуттєво. Вказаний ступінь зневоднення не впливає на життєздатність клітин, однак зменшує ймовірність виникнення внутрішньоклітинного льоду під час подальшого заморожування.

**Ключові слова:** фізико-математична модель, процеси масоперенесення, еритроцити, кріопротектори, трансмембранний потенціал.

**Abstract:** On the basis of the developed physical and mathematical model of mass transfer, which takes into account the transmembrane transfer of non-electrolytes, basic ions and the associated changes in the transmembrane potential, the redistribution of osmotically active substances during equilibration of erythrocytes in cryoprotective solutions was investigated. Time parameters of changes in concentrations of osmotically active substances inside and outside cells, as well as transmembrane electric potential, were calculated. It is shown that during the exposure of human erythrocytes to 1M solutions of glycerol, 1,2-propanediol (1,2-PD) and dimethylsulfoxide (DMSO), the sign of their transmembrane electric potential changes three times, and in solutions of ethylene glycol (EG) and of acetamide (AA) — once. The analysis of the obtained results showed that the most acceptable for further cryopreservation from the point of view of erythrocytes reaching a state close to equilibrium in a 1M solution of glycerol was their equilibration for 5.5 min, and in solutions of DMSO, AA, EG and 1,2-PD with the same concentration — 1 min. At the same time, the cells remain somewhat dehydrated (by 5.5–7.5%), and the concentrations of cryoprotectants inside erythrocytes change insignificantly during longer exposure. The indicated degree of dehydration does not affect cell viability, but reduces the likelihood of intracellular ice formation during subsequent freezing.

**Key words:** physico-mathematical model, mass transfer, erythrocytes, cryoprotectants, transmembrane potential.

Важливу роль у архітектурі та функціонуванні клітин відіграють електростатичні взаємодії. Гнучкість форми клітин забезпечує їхній рух та універсальність адаптації до навколишнього середовища. Гнучкість форми опосередковується різними типами взаємодій білок-мембрана, зокрема електростатичними [4]. Гідрофобні та електростатичні взаємодії мають синергетичний характер, що допомагає закріплювати важливі

Electrostatic interactions play an important role in the architecture and functioning of cells. The flexibility of the shape of cells ensures their movement and versatility of adaptation to the environment. The shape flexibility is mediated by various types of protein-membrane interactions, in particular electrostatic ones [4]. Hydrophobic and electrostatic interactions are synergic by origin, helping to anchor important proteins to membranes

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

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: olga.gordiyenko.ipcic@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: olga.gordiyenko.ipcic@gmail.com

Надійшла 13.01.2023

Прийнята до друку 17.05.2023

Received 13, January, 2023

Accepted 17, May, 2023

© Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2023  
© Publisher Publishing House 'Akadempriodyka' of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2023

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.

білки на мембранах [11]. Мембрана еритроцитів є складною з унікальними властивостями структурою, яка включає субмембранну решітку білків у вигляді мережі. Субмембранна мережа спектрину еритроцитів забезпечує їхню механічну стійкість зі збереженням гнучкості та деформованості, що притаманні клітині, яка протягом свого життя проходить через систему кровообігу приблизно 170 000 разів. А. Сіана та співавт. [5] показали, що збагачена сфінголіпідами та стійка до детергентів ліпідна частина мембрани еритроцитів пов'язана з цитоскелетом, від якого її можна відокремити лише шляхом підвищення рН та іонної сили середовища. Електростатичні взаємодії між детергент-резистентними рафтами і скелетом мембрани, ймовірно, відповідальні за їхню асоціацію. Також було виявлено, що ліпосоми фосфатидилсерину та фосфатидилетаноламіну зв'язуються зі спектрином на ділянках субодиниць  $\alpha$ - та  $\beta$ -спектрину. Можна припустити, що така асоціація включає пряму взаємодію між спектриновим скелетом та групами головок фосфоліпідів. Асоціація значної частини ліпідного подвійного шару у формі ліпідних рафтів з базовим скелетом мембрани може являти собою додатковий вертикальний зв'язок, який надає стійкості клітинній мембрані. А. Сіана та співавт. [5] вказали на доцільність оцінки впливу цього зв'язку на визначення стабільності та інших властивостей мембрани еритроцитів, а також існування його природних дефектів, які можуть бути пов'язані з аномаліями в архітектурі мембрани еритроцитів. У роботі Е. Кахана та співавт. [10] також представлені докази того, що електростатичні сили відіграють основну роль у взаємодії між клітинною мембраною та цитоскелетом еритроцитів людини. Результати експериментів щодо впливу варіації іонної сили та різних іонів на вивільнення спектрину з тіней еритроцитів узгоджуються з концепцією електростатичної взаємодії між мембраною та цитоскелетом. Електростатичні взаємодії впливають і на структуру самого спектрину еритроцитів. Ізольовані ланцюги  $\alpha$ - та  $\beta$ -спектрину зв'язуються електростатично один з одним у місцях поблизу хвоста спектрину. Двосторонні взаємодії за межами цих місць зародження є відносно слабкими, що дозволяє двом ланцюгам ковзати уздовж один одного, коли молекула спектрину згинається та розтягується під час деформації мембрани [12]. Очевидно, що будь-які зміни в електричних характеристиках клітинних мембран (поверхневий або трансмембранний потенціал) впливають на структурний та функціональний стан клітини.

[11]. The membrane of erythrocytes is a complex structure having unique properties and consisting of a submembrane lattice of proteins as a network. The submembrane spectrin network of erythrocytes ensures their mechanical stability while preserving the flexibility and deformability inherent in a cell that passes through the circulatory system approximately 170,000 times during its lifespan. A. Ciana *et al.* [5] showed that the sphingolipid-enriched and detergent-resistant lipid part of the erythrocyte membrane was associated with the cytoskeleton, from which it could be separated only by increasing the pH and ionic strength of the medium. Electrostatic interactions between detergent-resistant rafts and the membrane skeleton are probably responsible for their association. Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine liposomes were also found to bind to spectrin at the  $\alpha$ - and  $\beta$ -spectrin subunit sites. It can be assumed that such an association involves a direct interaction between the spectrin skeleton and the phospholipid head groups. The association of a significant part of the lipid bilayer as the lipid rafts with the basic skeleton of the membrane may represent an additional vertical link that provides stability to the cell membrane. A. Ciana *et al.* [5] indicated the expediency of evaluating the impact of this relationship on determining the stability and other properties of the erythrocyte membrane, as well as the existence of its natural defects, which might be associated with abnormalities in the erythrocyte membrane architecture. E. Kahana *et al.* [10] also reported about an evidence that electrostatic forces play a major role in the interaction between the cell membrane and cytoskeleton in human erythrocytes. The results of experiments on the effect of variation of ionic strength and different ions on the release of spectrin from the erythrocyte shadows are consistent with the concept of electrostatic interaction between the membrane and the cytoskeleton. Electrostatic interactions affect the structure of erythrocyte spectrin itself. Isolated chains of  $\alpha$ - and  $\beta$ -spectrin bind electrostatically to each other in the sites near the spectrin tail. The two-way interactions outside these nucleation sites are relatively weak, allowing the two chains to slide along each other as the spectrin molecule bends and stretches during membrane deformation [12]. Any changes in the electrical characteristics of cell membranes (surface or transmembrane potential) obviously affect the structure and functions of the cell.

During low-temperature preservation, ion and water homeostasis of cells is significantly disturbed. Such disturbances occur at various stages of



У процесі низькотемпературного консервування суттєво порушується іонний і водний гомеостаз клітин. Такі порушення відбуваються на різних етапах низькотемпературного консервування і обумовлені дегідратацією та регідратацією клітин, виходом з цитоплазми або надходженням до неї основних іонів, що забезпечують іонний баланс клітини. Ці процеси можуть відображатися на значеннях трансмембранного електричного потенціалу клітин, який генерується різницею концентрацій іонів із двох сторін бішару.

Отже, фізико-математичне моделювання процесів масоперенесення крізь клітинну мембрану для визначення зміни концентрацій осмотично активних речовин всередині і ззовні клітини під час її перебування в гіпертонічному розчині кріопротектора та прогнозування оптимальних режимів еквілібрації і заморожування має враховувати не тільки перенесення електронейтральних молекул (води та кріопротекторів), але і рух іонів між внутрішньо- та позаклітинним середовищами та зміни трансмембранного електричного потенціалу клітин.

Для кріоконсервування різних типів клітин використовують різні об'єми кріопротекторних розчинів. Під час еквілібрації та подальшого кріоконсервування поодиноких клітин, наприклад ооцитів, об'єм розчину кріопротектора значно перевищує їхній об'єм. Це приводить до того, що під час еквілібрації поодинокі клітини в кріопротекторному середовищі концентрації позаклітинних речовин практично залишаються постійними, а зміни концентрацій відбуваються тільки всередині клітини. На відміну від ооцитів суспензія еритроцитів у вигляді еритроконцентрату змішується з рівним об'ємом розчину кріопротектора [13]. Тому об'єм позаклітинного розчину, що припадає на одну клітину в суспензії, є порівняним з об'ємом клітини. У даному випадку зміни концентрацій осмотично активних речовин у позаклітинному середовищі можуть бути суттєвими. Наприклад, концентрація кріопротектора в позаклітинному розчині може знижуватися до 50%. Це стосується і перерозподілу іонів між поза- та внутрішньоклітинним середовищами, що буде впливати на зміни трансмембранного електричного потенціалу. При цьому еквілібрація еритроцитів у розчині кріопротектора проводиться протягом 30 хв (1800 с).

Метою роботи є теоретичне прогнозування перерозподілу осмотично активних речовин і змін трансмембранного потенціалу в процесі еквілібрації суспензії еритроцитів у гіпертонічних розчинах кріопротектора.

low-temperature preservation and are caused by dehydration and rehydration of cells, exit from the cytoplasm or entry into it of basic ions that ensure the ionic balance of the cell. These processes can be reflected in the values of the transmembrane electric potential of cells, which is stipulated by the difference in ion concentrations from the two sides of the bilayer.

Therefore, physical-mathematical modeling of mass transfer processes through the cell membrane to determine the change in concentrations of osmotically active substances inside and outside the cell during its stay in a hypertonic cryoprotective solution and to predict optimal modes of equilibration and freezing must take into account not only the transfer of electroneutral molecules (water and cryoprotectants), but also the movement of ions between intra- and extracellular media and changes in the transmembrane electric potential of cells.

Different volumes of cryoprotective solutions are used for cryopreservation of different types of cells. During equilibration and subsequent cryopreservation of single cells, such as oocytes, the volume of the cryoprotectant solution significantly exceeds their volume. This leads to the fact that during the equilibration of a single cell in a cryoprotective medium, the concentrations of extracellular substances practically remain constant, and changes in concentrations occur only inside the cell. Unlike oocytes, erythrocyte suspension as the erythrocyte concentrate is mixed with an equal volume of cryoprotective solution [13]. Therefore, the volume of the extracellular solution per cell in suspension is comparable to the cell volume. In this case, changes in the concentrations of osmotically active substances in the extracellular medium can be significant. Namely, the concentration of cryoprotectant in the extracellular solution can decrease to 50%. This also applies to the redistribution of ions between the extracellular and intracellular media, which will affect changes in the transmembrane electric potential. At the same time, the erythrocytes in cryoprotective solution is equilibrated for 30 min (1,800 seconds).

The research aim was to theoretically predict the redistribution of osmotically active substances and changes in the transmembrane potential during the equilibration of the erythrocyte suspension in hypertonic cryoprotective solutions.

### Materials and methods

*Initial starting points for calculations.* With the use of our own mathematical model [14], we calculated the redistribution of cryoprotectant and ions between the extracellular and intracellular



## Матеріали та методи

*Вихідні умови для розрахунків.* З використанням розробленої нами математичної моделі [14] були проведені розрахунки перерозподілу кріопротектора та іонів між поза- і внутрішньоклітинним середовищами еритроцитів людини з визначенням трансмембранного електричного потенціалу. Розрахунки здійснювали за умови, що еритроконцентрат з гематокритом 85% і об'ємом 1 мл ( $10^{-6}$  м<sup>3</sup>) змішується при температурі 20°C з рівним об'ємом 1М кріопротектора. При цьому вважається, що однорідна концентрація кріопротектора досягається миттєво, концентрація компонентів розчину є рівномірною по всьому об'єму як у позаклітинному, так і внутрішньоклітинному середовищах. Об'єм середнього за розмірами еритроцита становить  $9,791 \times 10^{-17}$  м<sup>3</sup> [9], об'єм всіх еритроцитів у еритроконцентраті —  $0,85 \times 10^{-6}$  м<sup>3</sup>, а об'єм позаклітинного середовища —  $1,15 \times 10^{-6}$  м<sup>3</sup>. З цих даних випливає, що загальна кількість еритроцитів у суспензії складає  $8,68144214 \times 10^9$  клітин. Враховуючи об'єм позаклітинного середовища та загальну кількість еритроцитів, отримуємо об'єм позаклітинного середовища, який припадає на один еритроцит  $1,32466471 \times 10^{-16}$  м<sup>3</sup>, тобто об'єм позаклітинного середовища на один еритроцит є близьким до об'єму еритроцита. Початкова концентрація кріопротектора в кріопротекторному розчині, який додається до еритроконцентрату, становить 1М. Оскільки об'єм позаклітинного розчину збільшується за рахунок міжклітинного середовища еритроконцентрату в 1,15 раза, то концентрація кріопротектора в кінцевій суспензії становить 0,87М.

Розрахунки виконуємо з огляду на те, що у поза- і внутрішньоклітинному середовищах змінюється тільки кількість іонів хлору, а кількість іонів калію і натрію залишається постійною. Це обумовлено тим, що в часових масштабах процесів, що розглядаються, мембрани еритроцитів можна вважати непроникними для іонів калію і натрію. Постійна кількість катіонів у зовнішньому і внутрішньому середовищах враховується для визначення концентрацій води, кріопротектора та аніонів хлору.

В усіх випадках початковий електричний потенціал мембрани еритроцита становить  $-9,11 \times 10^{-3}$  В.

Для моделювання були вибрані кріопротектори: гліцерин (Гл), диметилсульфоксид (ДМСО), ацетамід (АА), 1,2-пропандіол (1,2-ПД), етиленгліколь (ЕГ). Для розрахунків використовували наступні коефіцієнти проникності осмотично активних речовин крізь мембрану еритроцита:

media in human erythrocytes and determine the transmembrane electric potential. Calculations were made when the erythrocyte concentrate with a hematocrit of 85% in a volume of 1 ml ( $10^{-6}$  м<sup>3</sup>) was mixed at a temperature of 20°C with an equal volume of 1M cryoprotectant. At the same time, a homogenous concentration of the cryoprotectant is considered to be achieved instantly, the concentration of the components of the solution is uniform throughout the volume in both the extracellular and intracellular media. The volume of the average size of the erythrocyte is  $9.791 \times 10^{-17}$  м<sup>3</sup> [9], the volume of all erythrocytes in the erythroconcentrate is  $0.85 \times 10^{-6}$  м<sup>3</sup>, and the volume of the extracellular medium is  $1.15 \times 10^{-6}$  м<sup>3</sup>. These data demonstrate that the total number of erythrocytes in the suspension is  $8.68144214 \times 10^9$  cells. Taking into account the volume of the extracellular medium and the total number of erythrocytes, we get the volume of the extracellular medium, which per erythrocyte is  $1.32466471 \times 10^{-16}$  м<sup>3</sup>, that is, the volume of the extracellular medium per erythrocyte is close to the erythrocyte volume. The initial concentration of the cryoprotectant in the cryoprotective solution, which is added to the erythroconcentrate, is 1M. Since the volume of the extracellular solution increases by 1.15 times due to the intercellular medium of the erythroconcentrate, the concentration of the cryoprotectant in the final suspension is 0.87M.

We perform the calculations taking into account the fact that only the amount of chlorine ions changes in the extracellular and intracellular media, while the amount of potassium and sodium ions remains constant. This is due to the fact that in the time scales of the considered processes, the membranes of erythrocytes can be considered impermeable to potassium and sodium ions. The constant amount of cations in the external and internal media is considered to determine the concentrations of water, cryoprotectant and chlorine anions.

In all cases, the initial electrical potential of the erythrocyte membrane is  $-9.11 \times 10^{-3}$  V.

The following cryoprotectants were selected for modeling: glycerol, dimethylsulfoxide (DMSO), acetamide (AA), 1,2-propanediol (1,2-PD), ethylene glycol (EG). The following permeability coefficients of osmotically active substances through the erythrocyte membrane were used for calculations: water –  $5.3 \times 10^{-5}$  m/s [1], DMSO –  $1.37 \times 10^{-6}$  m/s [2], AA –  $2.66 \times 10^{-6}$  m/s [6], glycerol –  $3.8 \times 10^{-8}$  m/s, 1,2-PD –  $1.6 \times 10^{-6}$  m/s, EG –  $1.98 \times 10^{-6}$  m/s [7], chlorine –  $1.42 \times 10^{-6}$  m/s [3]. Quantitative composition of ions outside/inside the erythrocyte: chlorine – 116/78.8 mM [8],



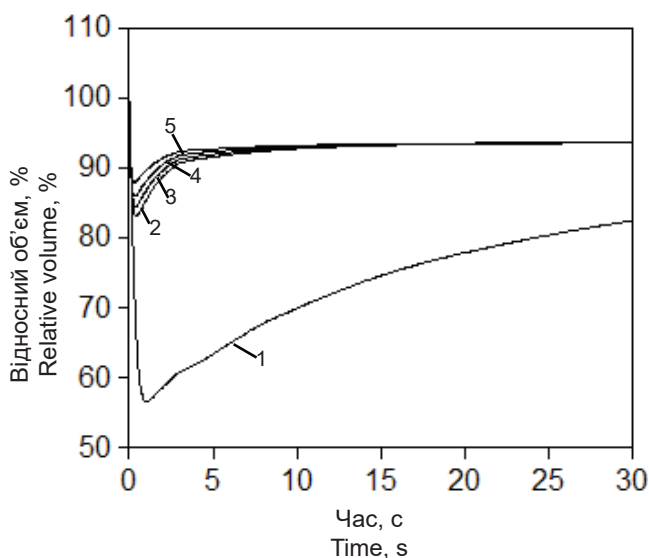


вода —  $5,3 \times 10^{-5}$  м/с [1], ДМСО —  $1,37 \times 10^{-6}$  м/с [2], АА —  $2,66 \times 10^{-6}$  м/с [6], Гл —  $3,8 \times 10^{-8}$  м/с, 1,2-ПД —  $1,6 \times 10^{-6}$  м/с, ЕГ —  $1,98 \times 10^{-6}$  м/с [7], хлор —  $1,42 \times 10^{-6}$  м/с [3]. Кількісний склад іонів ззовні/всередині еритроцита: хлор — 116/78,8 мМ [8], натрій — 150,1/12,9 мМ, калій — 5,47/136,08 мМ [15].

### Результати та обговорення

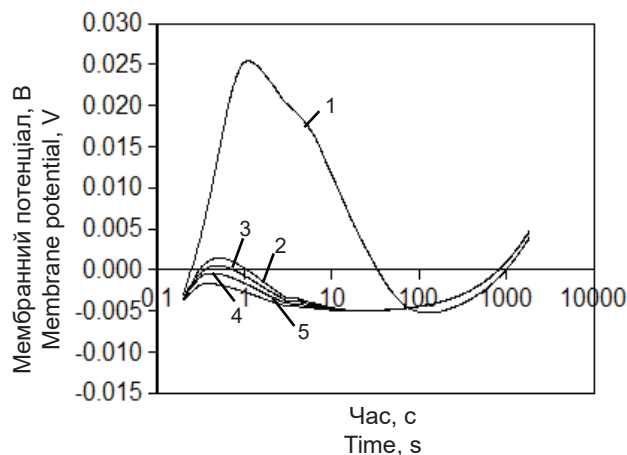
На рис. 1 наведено динаміку зміни відносного об'єму еритроцита під час експозиції в 1М розчинах АА, ЕГ, 1,2-ПД, ДМСО і Гл. З розрахунків одержано мінімальний об'єм, якого досягає еритроцит у розчинах: Гл — 56,6% через 1 с, ДМСО — 83,1% через 0,4 с, 1,2-ПД — 84,4% через 0,4 с, ЕГ — 85,9% через 0,3 с і АА — 87,8% через 0,3 с.

На рис. 2 наведено залежності мембранного електричного потенціалу еритроцитів від часу експозиції в розчинах Гл, ДМСО, 1,2-ПД, ЕГ і АА. Згідно з розрахунками під час експозиції трансмембранний електричний потенціал еритроцитів швидко зменшується за абсолютною величиною, а в розчинах Гл, ДМСО та 1,2-ПД змінює знак. Досягнувши свого максимуму, потенціал починає падати, набуває мінімального значення і знов поволі підвищується та змінює знак вже у всіх випадках. Отже, протягом експозиції відбувається переполяризація мембрани, причому в розчинах Гл, ДМСО і 1,2-ПД цей процес відбувається тричі. Наприклад, у розчині Гл трансмембранний електричний



**Рис. 1.** Залежність відносного об'єму еритроцита від часу еквілібрації в 1М розчинах криопротекторів: Гл (1), ДМСО (2), 1,2-ПД (3), ЕГ (4), АА (5).

**Fig. 1.** Dependence of the erythrocyte relative volume on equilibration time in 1M solutions of cryoprotectants: glycerol (1), DMSO (2), 1,2-PD (3), EG (4), AA (5).



**Рис. 2.** Залежність мембранного електричного потенціалу еритроцита від часу еквілібрації в 1М розчинах криопротекторів: Гл (1), ДМСО (2), 1,2-ПД (3), ЕГ (4), АА (5).

**Fig. 2.** Dependence of the erythrocyte membrane electric potential on equilibration time in 1M solutions of cryoprotectants: glycerol (1), DMSO (2), 1,2-PD (3), EG (4), AA (5).

sodium — 150.1/12.9 мМ, potassium — 5.47/136.08 мМ [15].

### Results and discussion

Fig. 1 shows the dynamics of changes of the relative volume in erythrocytes during exposure to 1M solutions of AA, EG, 1,2-PD, DMSO and glycerol. From the calculations, the minimum volume reached by an erythrocyte in solutions was obtained: glycerol — 56.6% after 1 s, DMSO — 83.1% after 0.4 s, 1,2-PD — 84.4% after 0.4 s, EG — 85.9% after 0.3 s and AA — 87.8% after 0.3 s.

Fig. 2 demonstrates the dependence of the membrane electric potential of erythrocytes on the exposure time in solutions of glycerol, DMSO, 1,2-PD, EG and AA. By our computations during exposure, the transmembrane electric potential of erythrocytes rapidly decreases in absolute value, and changes its sign in glycerol, DMSO, and 1,2-PD solutions. Having reached its maximum, the potential begins to fall, acquires a minimum value and again slowly rises and changes its sign already in all cases. Therefore, during exposure, the membrane repolarizes, and in solutions of glycerol, DMSO, and 1,2-PD, this process occurs thrice. For example, in glycerol solution, the transmembrane electric potential changes from  $-9.11 \times 10^{-3}$  to  $25.4 \times 10^{-3}$  V in 1.1 s, after 125 s it changes to  $-5.24 \times 10^{-3}$  V, and after 975 s it changes its sign again and reaches  $3.9 \times 10^{-3}$  V after 1,800 s. Table 1 shows the extreme values of the electric potential of the erythrocyte membrane and the time to reach them during exposure of the erythrocyte to 1M solutions of various cryoprotectants.



**Таблиця 1.** Екстремальні значення електричного потенціалу мембрани еритроцита і час їх досягнення в процесі еквілібрації в 1М розчинах криопротекторів

**Table 1.** Extreme values of electric potential of erythrocyte membrane and the time of their achievement during equilibration in 1M solutions of cryoprotectants

Криопротектор Cryoprotectant	Максимум потенціалу Maximum potential		Мінімум потенціалу Minimum potential		Потенціал через 1800 с, $\times 10^{-3}$ В Potential after 1800 s, $\times 10^{-3}$ V
	$\times 10^{-3}$ В $\times 10^{-3}$ V	Час, с Time, s	$\times 10^{-3}$ В $\times 10^{-3}$ V	Час, с Time, s	
Гліцерин Glycerol	+ 25,4	1,1	-5,24	125	+ 3,922
ДМСО DMSO	+ 1,46	0,5	-4,982	24	+ 4,671
1,2-ПД 1,2-PD	+ 0,551	0,5	-4,978	23	+ 4,678
ЕГ EG	-0,44	0,4	-4,975	21	+ 4,684
АА	-1,695	0,4	-4,976	19	+ 4,693

потенціал змінюється від  $-9,11 \times 10^{-3}$  до  $25,4 \times 10^{-3}$  В за 1,1 с, через 125 с змінюється до  $-5,24 \times 10^{-3}$  В, а через 975 с знову міняє знак і сягає  $3,9 \times 10^{-3}$  В через 1800 с. У табл. 1 наведено екстремальні значення електричного потенціалу мембрани еритроцита і час їх досягнення в процесі експозиції еритроцита в 1М розчинах різних криопротекторів.

Розрахункові графіки концентрації іонів хлору всередині еритроцита під час експозиції в розчинах різних криопротекторів наведено на рис. 3. Початкова концентрація іонів хлору в цитоплазмі еритроцита становить 78,8 мМ. В усіх випадках концентрація іонів хлору спочатку швидко досягає максимуму, потім знижується до проміжного мінімуму, а далі поступово підвищується. В жодному випадку концентрації іонів хлору в цитоплазмі не зрівнювалися з їх початковим значенням. Екстремальні значення концентрації іонів хлору в цитоплазмі еритроцита і час їх досягнення в процесі експозиції еритроцита в 1М розчинах криопротекторів подано в табл. 2.

З табл. 1 і 2 видно, що екстремальні значення трансмембранного електричного потенціалу і концентрацій іонів хлору досягаються майже одночасно, особливо для першого екстремуму, розбіжність якого за часом не перевищує 0,1 с, а для другого екстремуму вона досягає 1–3 с для різних криопротекторів.

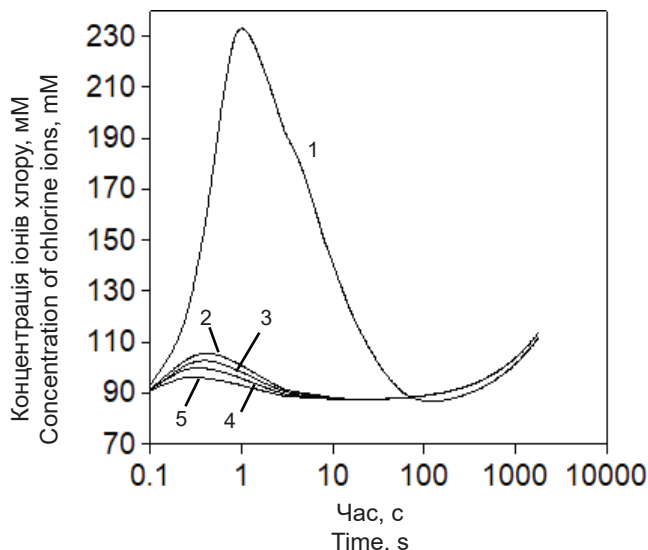
У роботі ми не наводили графіки зміни концентрацій іонів натрію і калію, оскільки їхня кількість вважається постійною, а концентрація змінюється зворотно пропорційно зміні об'єму еритроцита.

На рис. 4, 5 подано графіки зміни концентрацій Гл та ДМСО у поза- і внутрішньоклітин-

The Fig. 3 presents the calculated graphs of the concentration of chlorine ions inside the erythrocyte during exposure in solutions of various cryoprotectants. The initial concentration of chlorine ions in the erythrocyte cytoplasm is 78.8 mM. In all cases, the concentration of chlorine ions first quickly reaches a maximum, then decreases to an intermediate minimum, and then gradually increases. In no case did the concentrations of chlorine ions in the cytoplasm equal their initial value. The extreme values of the concentration of chlorine ions in the erythrocyte cytoplasm and the time of their achievement

during the exposure of the erythrocyte to 1M solutions of cryoprotectants are presented in Table 2. Tables 1 and 2 illustrate that the extreme values of the transmembrane electric potential and concentrations of chlorine ions are reached almost simultaneously, especially for the first extremum, the time difference of which does not exceed 0.1 s, and for the second extremum it reaches 1–3 s. for various cryoprotectants.

In our research we did not show the graphs of changes of the concentration of sodium and potassium ions, since their number was conside-



**Рис. 3.** Залежність концентрації іонів хлору в цитоплазмі еритроцита від часу еквілібрації в 1М розчинах криопротекторів: Гл (1), ДМСО (2), 1,2-ПД (3), ЕГ (4), АА (5).

**Fig. 3.** Dependence of the concentration of chlorine ions in the erythrocyte cytoplasm on the equilibration time to 1M solutions of cryoprotectants: glycerol (1), DMSO (2), 1,2-PD (3), EG (4), AA (5).



**Таблиця 2.** Екстремальні значення концентрації іонів хлору в цитоплазмі еритроцита і час їх досягнення в процесі еквілібрації в 1М розчинах кріопротекторів

**Table 2.** Extreme values of chlorine ions' concentration in erythrocyte cytoplasm and time to reach them during equilibration in 1M solutions of cryoprotectants

Кріопротектор Cryoprotectant	Максимум концентрації Maximum concentration		Мінімум концентрації Minimum concentration		Концентрація через 1800 с Concentration after 1800 s
	мМ	Час, с Time, s	мМ	Час, с Time, s	
Гліцерин Glycerol	232,96	1	86,69	122	111,63
ДМСО DMSO	105,45	0,4	87,42	22	113,52
1,2-ПД 1,2-PD	102,64	0,4	87,43	21	113,54
ЕГ EG	99,66	0,3	87,44	20	113,56
АА	96,04	0,3	87,44	18	113,58

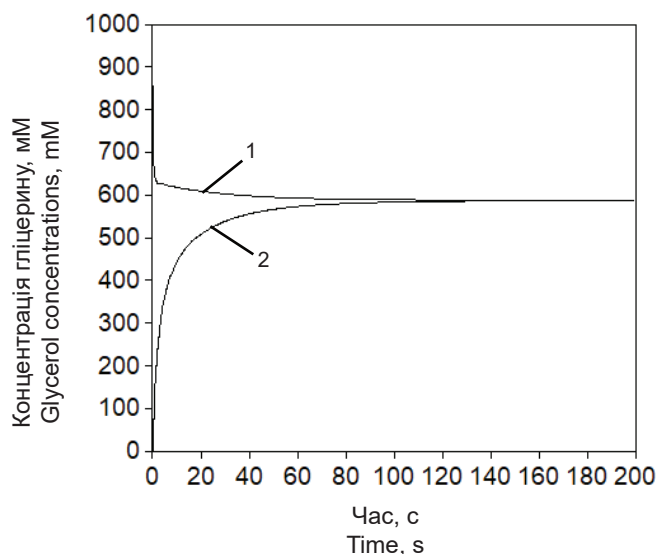
ному середовищах еритроцитів залежно від часу експозиції в розчинах кріопротекторів (графіки для ЕГ, 1,2-ПД та АА аналогічні графіку для ДМСО). З результатів розрахунків випливає, що концентрації кріопротекторів ззовні і всередині клітини вирівнюються доволі швидко. Так, під час експозиції еритроцитів у розчині Гл його концентрація всередині еритроцита сягала 586,65 мМ через 200 с експозиції, а ззовні — 587,67 мМ. В інших кріопротекторах вирівнювання концентрацій було набагато швидшим. Так, вже через 20 с експозиції еритроцитів у розчині ДМСО внутрішня/зовнішня концентрації кріопротектора були 587,07/587,5 мМ, у розчині 1,2-ПД — 587,11/587,48 мМ, а в розчинах ЕГ та АА вони дорівнювали 587,16/587,59 і 587,2/587,44 мМ відповідно. В усіх випадках через 1800 с експозиції концентрації всередині і ззовні клітини повністю не зрівнювались, різниця була від кількох десятих до кількох сотих мілімоля.

Для подальшого аналізу досліджуваних характеристик було вибрано реперні точки, після досягнення яких еквілібрація еритроцитів у розчинах кріопротекторів може бути припинена (табл. 3): 1 — величина трансмембранного електричного потенціалу  $\Delta\phi$  після етапу зневоднення еритроцита, яка найбільш наближена до початкового значення ( $-9,11 \times 10^{-3}$  В); 2 — час досягнення відносної різниці  $\epsilon$  між концентраціями кріопротектора всередині та ззовні еритроцита, яка на кожному подальшому аналогічному часовому інтервалі змінюється менше ніж на 0,0001% для всіх кріопротекторів:

$$\epsilon = \frac{C_{\text{cpout}} - C_{\text{cpin}}}{C_{\text{cpout}}} \times 100 \quad (C_{\text{cpout}} \text{ і } C_{\text{cpin}} \text{ — концентрації кріопротектора ззовні і всередині еритро-$$

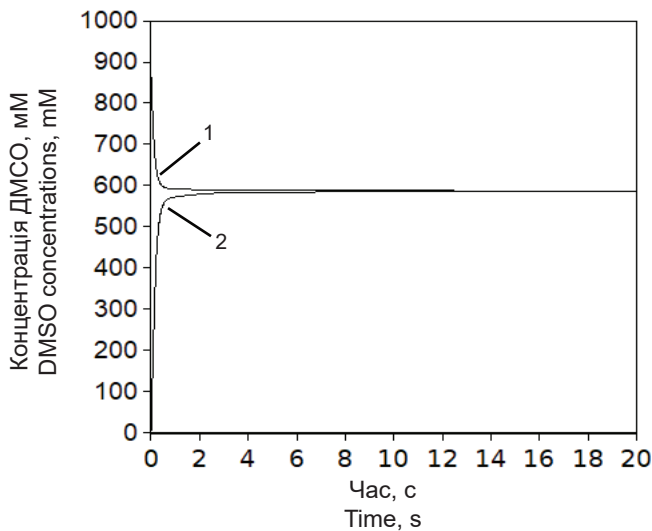
red constant, and the concentration changed inversely proportional to that of the erythrocyte volume.

Fig. 4, 5 show the graphs of changes in concentrations of glycerol and DMSO in the extracellular and intracellular media of erythrocytes depending on the exposure time in cryoprotective solutions (the graphs for EG, 1,2-PD and AA are similar to the graph for DMSO). The results of the calculations demonstrate that the concentrations of cryoprotectants outside and inside the cell equalize quite quickly. Thus, during the exposure of erythrocytes in the glycerol solution, its concentration inside the erythrocyte reached 586.65 mM after 200 s of exposure, and 587.67 mM outside. In other cryoprotectants, the leveling of concentrations



**Рис. 4.** Залежність концентрацій гліцерину ззовні (1) та всередині (2) еритроцита від часу еквілібрації.

**Fig. 4.** Dependence of glycerol concentrations outside (1) and inside (2) the erythrocyte on equilibration time.



**Рис. 5.** Залежність концентрацій ДМСО ззовні (1) та всередині (2) еритроцита від часу еквілібрації.

**Fig. 5.** Dependence of DMSO concentrations outside (1) and inside (2) of the erythrocyte on equilibration time.

цита відповідно); 3 — час досягнення еритроцитом початкового об'єму (100%); 4 — час експозиції еритроцитів у розчинах кріопротекторів 30 хв (1800 с) [13].

Аналіз даних показав, що під час еквілібрації еритроцитів в 1М розчині Гл початковий об'єм еритроцита досягається через 1254 с (майже 21 хв). При цьому концентрація Гл всередині еритроцита є меншою ніж через 1800 с (30 хв) експозиції на 0,014 мМ (лише на 0,024%), а відносна різниця між концентраціями кріопротектора всередині та ззовні еритроцита більша лише на 0,0028%. Для інших кріопротекторів ця різниця є ще меншою. Отже, еквілібрувати еритроцити з цими кріопротекторами протягом 30 хв немає сенсу. Навіть для Гл, коефіцієнт проникності якого є суттєво нижчим за коефіцієнти проникності для інших кріопротекторів, час еквілібрації може не перевищувати 21 хв, для інших кріопротекторів — 18 хв.

З розрахунків видно, що починаючи з певного часу експозиції зміни концентрацій кріопротекторів всередині і ззовні еритроцита відбуваються дуже повільно і несуттєво (рис. 4, 5). Також несуттєво змінюється і відносна різниця концентрацій кріопротектора ззовні і всередині еритроцита. Для 1М розчину Гл величина зміни відносної різниці між концентраціями кріопротектора ззовні та всередині еритроцита  $\varepsilon$  сягає 0,14106% через 328 с і 0,141009% через 329 с експозиції, тобто на часовому інтервалі, який складає 1 с, різниця між значеннями  $\varepsilon$  є меншою за 0,0001% і продовжує зменшуватися на кожному наступному інтервалі. Для решти кріо-

was much faster. Thus, after 20 s of exposure of erythrocytes in the DMSO solution, the internal/external concentrations of the cryoprotectant were 587.07/587.5 mM, in the 1,2-PD solution – 587.11/587.48 mM, and in the EG and AA solutions they were equal to 587.16/587.59 and 587.2/587.44 mM, respectively. In all cases, after 1,800 s of exposure, the concentrations inside and outside the cells were not completely equalized, the difference was from a few tenths to a few hundredths of a millimol.

For further analysis of the studied characteristics, the reference points have been selected, after reaching which the equilibration of erythrocytes in cryoprotectant solutions can be stopped (Table 3): 1 – the value of transmembrane electric potential  $\Delta\varphi$  after the stage of dehydration of the erythrocyte, which is closest to the initial value ( $-9.11 \times 10^{-3}$  V); 2 – the time to reach the relative difference  $\varepsilon$  between the concentrations of the cryoprotectant inside and outside the erythrocyte, which at each subsequent similar time interval changes by less than 0.0001% for all cryo-

protectants:  $\varepsilon = \frac{C_{\text{cpout}} - C_{\text{cpin}}}{C_{\text{cpout}}} \times 100$  ( $C_{\text{cpout}}$  and  $C_{\text{cpin}}$  –

the concentrations of the cryoprotectant outside and inside erythrocyte, respectively); 3 – time for the erythrocyte to reach the initial volume (100%); 4 – exposure time of erythrocytes in cryoprotectant solutions 30 min (1,800 s) [13].

Data analysis showed that during the equilibration of erythrocytes in a 1M solution of glycerol, the initial volume of erythrocyte is reached after 1,254 s (almost 21 min). At the same time, the glycerol concentration inside the erythrocyte is lower than after 1,800 s (30 min) of exposure by 0.014 mM (only by 0.024%), and the relative difference between concentrations of cryoprotectant inside and outside the erythrocyte is only 0.0028% higher. For other cryoprotectants, this difference is even smaller. Therefore, it makes no sense to equilibrate erythrocytes with these cryoprotectants for 30 min. Even for glycerol, the permeability coefficient of which is significantly lower than the permeability coefficients for other cryoprotectants, the equilibration time may not exceed 21 min, for other cryoprotectants it does 18 min. The calculations give an idea that starting from a certain time of exposure, changes in the concentrations of cryoprotectants inside and outside the erythrocyte occur very slowly and slightly (Figs. 4, 5). Also, the relative difference in cryoprotectant concentrations outside and inside the erythrocyte also changes insignificantly. For a 1M glycerol





**Таблиця 3.** Реперні точки часу еквілібрації еритроцитів у розчинах криопротекторів  
**Table 3.** Benchmark time points of erythrocyte equilibration in cryoprotectant solutions

Кріопротектор Cryoprotectant	Реперна точка Benchmark point	Час, с Time, s	Відносний об'єм еритроцита, % Erythrocyte relative volume; %	$C_{\text{спін}}$ , мМ	$C_{\text{срout}}$ , мМ	$\epsilon$ , %	$\Delta\phi$ , $\times 10^{-3}$ В
Гліцерин Glycerol	1	125	92,578	585,312	588,202	0,491461	-5,236
	2	329	94,32	586,788	587,617	0,141009	-3,956
	3	1254	100	586,923	587,586	0,112789	+1,436
	4	1800	102,93	586,937	587,583	0,109942	+3,922
ДМСО DMSO	1	24	93,463	587,19	587,44	0,043123	-4,982
	2	45	93,66	587,302	587,4	0,016823	-4,861
	3	1053	100	587,32	587,4	0,012718	+1,295
	4	1800	104,04	587,33	587,39	0,010951	+4,671
АА	1	19	93,46	587,21	587,44	0,039978	-4,976
	2	39	93,66	587,301	587,4	0,016904	-4,865
	3	1047	100	587,32	587,39	0,01268	+1,293
	4	1800	104,69	587,33	587,39	0,010912	+4,694
ЕГ EG	1	21	93,46	587,20	587,44	0,042196	-4,975
	2	40	93,65	587,3	587,4	0,017102	-4,872
	3	1049	100	587,32	587,40	0,012687	+1,291
	4	1800	104,06	587,33	587,39	0,010916	+4,684
1,2-ПД 1,2-PD	1	23	93,47	587,2	587,44	0,04036	-4,978
	2	43	93,66	587,302	587,4	0,016739	-4,863
	3	1051	100	587,32	587,4	0,0126	+1,294
	4	1800	104,05	587,33	587,39	0,01093	+4,678

протекторів час експозиції, після якого зміни концентрацій криопротекторів всередині і ззовні еритроцита стають несуттєвими,  $\epsilon$  меншим за 50 с. Різниця концентрацій Гл всередині еритроцита після експозиції протягом 1800 і 329 с становить 0,149 мМ (або 0,025%). Для інших криопротекторів вона  $\epsilon$  ще меншою. Причому трансмембранний електричний потенціал еритроцита у реперній точці 2 залишається негативним для всіх досліджених криопротекторів. У той самий час відносний об'єм еритроцита не встигає досягти початкової величини, і клітини залишаються дещо зневодненими (5,7–6,35%). Такий рівень зневоднення не має вплинути на життєздатність клітин, але може зменшити ймовірність виникнення внутрішньоклі-

solution, the amount of change in the relative difference between the concentrations of cryoprotectant outside and inside the erythrocyte  $\epsilon$  reaches 0.14106% after 328 s and 0.141009% after 329 s of exposure, *i. e.* at a time interval of 1 s, the difference between the values of  $\epsilon$  is smaller by 0.0001% and continues to decrease at each subsequent interval. For the rest of the cryoprotectants, the exposure time, after which changes in the concentrations of cryoprotectants inside and outside the erythrocyte become insignificant, is less than 50 s. The difference in concentrations of glycerol inside the erythrocyte after exposure for 1800 and 329 s is 0.149 mM (or 0.025%). For other cryoprotectants, it is even smaller. Moreover, the transmembrane electric potential of the erythrocyte at reference

тинного льоду, а мембрани клітин є ненапруженими.

Для всіх досліджених кріопротекторів за час досягнення початкового об'єму еритроцитом (реперна точка 3), а також через 1800 с експозиції (реперна точка 4) трансмембранний електричний потенціал змінює свій знак з негативного на позитивний, тобто відбувається переполяризація мембрани, а для Гл, 1,2-ПД і ДМСО така зміна відбувається тричі. Це може мати негативні наслідки для клітин. Тому однією з реперних точок обрано час досягнення електричним потенціалом значення, яке найбільш наближене до первинного на етапі відновлення об'єму еритроцита (реперна точка 1). Так, у розчині Гл трансмембранний електричний потенціал сягає  $-5,2358 \times 10^{-3}$  В через 125 с. Для решти кріопротекторів час досягнення найбільш наближеного до первинного значення трансмембранного потенціалу є меншим за 25 с. При цьому різниця між концентраціями Гл всередині еритроцита після експозиції протягом 1800 с і 125 с становить 1,625 мМ (0,277%). Для інших кріопротекторів ця різниця є суттєво меншою, а трансмембранний електричний потенціал залишається негативним для всіх кріопротекторів.

Відносний об'єм еритроцита в реперних точках 1 і 2 не досягає початкової величини під час еквілібрації у всіх розглянутих кріопротекторах, і клітини залишаються дещо зневодненими (на 5,5–7,5%).

Результати розрахунків показали, що найбільш прийнятною для припинення еквілібрації еритроцитів у розчині кріопротектора є реперна точка 2. У цій точці трансмембранний електричний потенціал залишається негативним для всіх розглянутих кріопротекторів, а клітини є дещо зневодненими, тобто їх мембрани не напружені. До того ж різниця між концентраціями кріопротекторів ззовні та всередині клітин є незначною, і протягом подальшої їх еквілібрації в розчині кріопротектора зменшується несуттєво, навіть у порівнянні з реперною точкою 4, в якій час експозиції найбільший. Таким чином можна суттєво скоротити час еквілібрації еритроцитів порівняно з передбаченим у загальноприйнятому протоколі [13] і не допустити додаткової переполяризації мембрани.

### Висновки

Найбільш прийнятним для подальшого кріоконсервування еритроцитів з точки зору досягнення показників, які наближені до рівноважного стану, в 1М розчині гліцерину є їх еквілібрація протягом 5,5 хв (відносний об'єм

point 2 remains negative for all the investigated cryoprotectants. At the same time, the relative volume of the erythrocyte does not have time to reach the initial value, and the cells remain somewhat dehydrated (5.7–6.35%). This level of dehydration should not affect cell viability, but may reduce the likelihood of intracellular ice formation and cell membranes are relaxed.

For all investigated cryoprotectants, during the time when the erythrocyte reaches its initial volume (reference point 3), as well as after 1,800 s of exposure (reference point 4), the transmembrane electric potential changes its sign from negative to positive, *i. e.*, membrane repolarization occurs, and for glycerol, 1,2-PD and DMSO, this change occurs thrice. This can have negative consequences for the cells. Therefore, one of the reference points was chosen as the time when the electric potential reached the value closest to the initial value at the stage of erythrocyte volume recovery (reference point 1). Thus, in glycerol solution, the transmembrane electric potential reaches  $-5.2358 \times 10^{-3}$  V after 125 s. For the rest of the cryoprotectants, the time to reach the transmembrane potential closest to the initial value is less than 25 seconds. At the same time, the difference between the concentrations of glycerol inside the erythrocyte after exposure to 1,800 s and 125 s is 1.625 mM (0.277%). For other cryoprotectants, this difference is significantly smaller, and the transmembrane electric potential remains negative for all cryoprotectants. The relative volume of erythrocyte at reference points 1 and 2 does not reach the initial value during equilibration in all considered cryoprotectants, and the cells remain slightly dehydrated (by 5.5–7.5%).

The results of the calculations showed that reference point 2 was the most appropriate for stopping the equilibration of erythrocytes in cryoprotective solution. At this point, the transmembrane electric potential remains negative for all considered cryoprotectants, and the cells are somewhat dehydrated, that is, their membranes are not stressed. In addition, the difference between the concentrations of cryoprotectants outside and inside the cells is insignificant, and during their further equilibration in the cryoprotectant solution, it decreases slightly, even in comparison with reference point 4, at which the exposure time is the longest. In this way, it is possible to significantly reduce the equilibration time of erythrocytes compared to that provided for in the generally accepted protocol [13] and prevent additional repolarization of membrane.



$V/V_0 = 94,3\%$ , трансмембранний потенціал  $\Delta\phi = -3,956$  мВ), а у розчинах ДМСО, ацетаміду, етиленгліколю і 1,2-пропандіолу — 1 хв (відносний об'єм  $V/V_0 \cong 93,7\%$ , трансмембранний потенціал  $\Delta\phi \cong -4,86$  мВ). При цьому клітини залишаються незначно зневодненими, трансмембранний електричний потенціал є негативним, а різниця між концентраціями криопротекторів всередині еритроцитів у порівнянні з концентраціями при більш тривалому часі еквілібрації у криопротекторному розчині не перевищує 0,025% для гліцерину та 0,005% для решти криопротекторів.

### Література

1. Benga G. Water transport in red blood cell membranes. *Progr Biophys Mol Biol.* 1988; 51: 193–245.
2. Best BP. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. *Rejuvenation research.* 2015; 18(5): 422–42.
3. Brahm J. The permeability of red blood cells to chloride, urea and water. *J Exp Biol.* 2013; 216(12): 2238–46.
4. Chervy P, Petcut C, Rault D, et al. Organic nanoscrolls from electrostatic interactions between peptides and lipids: assembly steps and structure. *Langmuir.* 2019; 35: 10648–57.
5. Ciana A, Achilli C, Balduini C, Minetti G. On the association of lipid rafts to the spectrin skeleton in human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1808: 183–90.
6. Gordiyenko OI, Gordiyenko YuE, Linnik TP, Gordiyenko EO. Experimental determination of human erythrocyte membrane permeability coefficients for a series of amides. *CryoLetters.* 2005; 26(1): 65–72.
7. Gordiyenko OI, Linnik TP, Gordiyenko EO. Erythrocyte membrane permeability for a series of diols. *Bioelectrochemistry.* 2004; 62: 115–8.
8. Funder J, Wieth JO. Chloride and hydrogen ion distribution between human red cells and plasma. *Acta Physiol Scand.* 1966; 68: 234–45.
9. Fung YC, Winston CO, Tsang WSO, Pacitucci P. High resolution data on the geometry of red blood cells. *Biorheology.* 1981; 18(2): 369–85.
10. Kahana E, Streichman S, Silver BL. The role of electrostatic forces in the interaction between the membrane and cytoskeleton of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1991; 1066(1): 1–5.
11. Murray D, Ben-Tal N, Honig B, McLaughlin S. Electrostatic interaction of myristoylated proteins with membranes: simple physics, complicated biology. *Structure.* 1997; 5(8): 985–9.
12. Samuel E Lux IV. Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. *Blood.* 2016; 127(2): 187–99.
13. Spettek A. Cryopreservation of red blood cells and platelets. *Methods Mol Biol.* 2007; 368: 283–301.
14. Todrin AF, Timofeyeva OV, Smolyaninova Yel et al. Physicalmathematical model of substance redistribution between the cell and its hypertonic solution environment of penetrating cryoprotectants with relevance to membrane potential. *CryoLetters.* 2020; 41(4): 209–15.

### Conclusions

The most acceptable for further cryopreservation of erythrocytes from the point of view of achieving the values close to the equilibrium state is their equilibration in a 1M glycerol solution for 5.5 min (relative volume  $V/V_0 = 94.3\%$ , transmembrane potential  $\Delta\phi = -3.956$  mV), and in solutions of DMSO, acetamide, ethylene glycol and 1,2-propanediol – 1 min (relative volume  $V/V_0 \cong 93.7\%$ , transmembrane potential  $\Delta\phi \cong -4.86$  mV). At the same time, the cells remain slightly dehydrated, the transmembrane electric potential is negative, and the difference between the concentrations of cryoprotectants inside erythrocytes in comparison with those during longer equilibration time in the cryoprotectant solution does not exceed 0.025% for glycerol and 0.005% for the rest of the cryoprotectants.

### References

1. Benga G. Water transport in red blood cell membranes. *Progr Biophys Mol Biol.* 1988. 51: 193–245.
2. Best BP. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. *Rejuvenation research.* 2015; 18(5): 422–42.
3. Brahm J. The permeability of red blood cells to chloride, urea and water. *J Exp Biol.* 2013; 216(12): 2238–46.
4. Chervy P, Petcut C, Rault D, et al. Organic nanoscrolls from electrostatic interactions between peptides and lipids: assembly steps and structure. *Langmuir.* 2019; 35: 10648–57.
5. Ciana A, Achilli C, Balduini C, Minetti G. On the association of lipid rafts to the spectrin skeleton in human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1808: 183–90.
6. Gordiyenko OI, Gordiyenko YuE, Linnik TP, Gordiyenko EO. Experimental determination of human erythrocyte membrane permeability coefficients for a series of amides. *CryoLetters.* 2005; 26(1): 65–72.
7. Gordiyenko OI, Linnik TP, Gordiyenko EO. Erythrocyte membrane permeability for a series of diols. *Bioelectrochemistry.* 2004; 62: 115–8.
8. Funder J, Wieth JO. Chloride and hydrogen ion distribution between human red cells and plasma. *Acta Physiol Scand.* 1966; 68: 234–45.
9. Fung YC, Winston CO, Tsang WSO, Pacitucci P. High resolution data on the geometry of red blood cells. *Biorheology.* 1981; 18(2): 369–85.
10. Kahana E, Streichman S, Silver BL. The role of electrostatic forces in the interaction between the membrane and cytoskeleton of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1991; 1066(1): 1–5.
11. Murray D, Ben-Tal N, Honig B, McLaughlin S. Electrostatic interaction of myristoylated proteins with membranes: simple physics, complicated biology. *Structure.* 1997; 5(8): 985–9.
12. Samuel E Lux IV. Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. *Blood.* 2016; 127(2): 187–99.



- 15.Valberg LS, Holt JM, Paulson E, Szivek J. Spectrochemical analysis of sodium, potassium, calcium, magnesium, copper, and zinc in normal human erythrocytes. J Clin Invest. 1965; 44(3): 379–89.
- 13.Sputtek A. Cryopreservation of red blood cells and platelets. Methods Mol Biol. 2007; 368: 283–301.
- 14.Todrin AF, Timofeyeva OV, Smolyaninova Yel et al. Physicalmathematical model of substance redistribution between the cell and its hypertonic solution environment of penetrating cryoprotectants with relevance to membrane potential. CryoLetters. 2020; 41(4): 209–15.
- 15.Valberg LS, Holt JM, Paulson E, Szivek J. Spectrochemical analysis of sodium, potassium, calcium, magnesium, copper, and zinc in normal human erythrocytes. J Clin Invest. 1965; 44(3): 379–9.

