

Витік калію і щільність розподілу за індексом сферичності в популяціях еритроцитів при експозиції в гіпертонічних розчинах хлориду натрію

Л.І. АЛЕКСЄЄВА, С.Є. КОВАЛЕНКО, В.С. ХОЛОДНИЙ, О.І. ГОРДІЄНКО
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Potassium Outflux and Distribution Density by the Sphericity Index in Erythrocytes Populations in Sodium Chloride Hypertonic Solutions

L.I. ALEKSEEVA, S.E. KOVALENKO, V.S. KHOLODNIY, O.I. GORDIYENKO
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Досліджено вплив часу експозиції еритроцитів людини в гіпертонічних розчинах хлористого натрію (0,4; 0,8; 1,2; 2,0 моль/л) від 30 с до 30 хв на щільність їх розподілу за індексом сферичності в популяції і на витік іонів калію з клітин. Показано, що при експозиції еритроцитів у гіпертонічних середовищах їх стан змінюється в залежності від часу експозиції і ступеня гіпертонічності середовища. Виявлені особливості стану еритроцитів за різних часів експозиції в помірно гіпертонічних середовищах (0,4-0,8 М NaCl) можуть бути пов'язані з модифікацією взаємодії мембранного бішару зі спектриновим цитоматриком та з латеральним перерозподілом мембранних компонентів у деформованій мембрані. При експозиції клітин у більш гіпертонічних розчинах (1,2-2 М NaCl) витік внутрішньоклітинного калію стає основним чинником, що впливає на розподіл еритроцитів за індексом сферичності при наступному вміщенні їх у ізотонічне середовище.

Ключові слова: гіпертонія, еритроцити, індекс сферичності, витік калію.

Исследовано влияние времени экспозиции эритроцитов человека в гипертонических растворах хлористого натрия (0,4; 0,8; 1,2; 2,0 моль/л) от 30 с до 30 мин на плотность их распределения по индексу сферичности в популяции и на утечку калия из клеток. Показано, что при экспозиции эритроцитов в гипертонических средах их состояние изменяется в зависимости от времени экспозиции и степени гипертоничности среды. Выявленные особенности состояния эритроцитов при разных временах экспозиции в умеренно гипертонических средах (0,4-0,8 М NaCl) могут быть связаны с модификацией взаимодействия мембранного бислоя со спектриновым цитоматриком и с латеральным перераспределением мембранных компонентов в деформированной мембране. При экспозиции клеток в более гипертонических растворах (1,2-2 М NaCl) утечка внутриклеточного калия становится основным фактором, влияющим на распределение эритроцитов по индексу сферичности при последующем помещении их в изотоническую среду.

Ключевые слова: гипертония, эритроциты, индекс сферичности, утечка калия.

The authors studied the effect of human erythrocyte exposure time (from 30 s to 30 min) in sodium chloride hypertonic solution (0.4; 0.8; 1.2; 2.0 mol/l) on its distribution density by sphericity index in population and on potassium outflux of the cells. It was shown, that when exposing erythrocytes in hypertonic medium their state changed depending on exposure time and medium hypertonicity rate. Obtained peculiarities in erythrocyte state at various exposition terms in moderately hypertonic media (0.4-0.8 М NaCl) might be associated with spectrine cytomatrix and lateral re-distribution on membrane components in deformed membrane. In the case of cells' exposition in more hypertonic solutions (1.2-2 М NaCl) the outflux of intracellular potassium became the main factor, affecting the erythrocyte distribution by sphericity index during their following placing into isotonic medium.

Key-words: hypertonicity, erythrocytes, sphericity index, potassium outflux.

Вивчення причин і механізмів сенсibiliзації або підвищення резистентності клітин до охолодження і, зокрема, вплив гіпертонії на клітини, є однією з центральних проблем кріобіології. Вплив гіпертонії проявляється в кріобіологічних процесах у різних аспектах: гіпертонічний лізис (ГЛ), постгіпертонічний лізис (ПГЛ) і гіпертонічний кріогемоліз (ГК). У певних умовах ці чинники можуть істотно вплинути на результат кріоконсервування. Тому дослідження процесів, що відбуваються в клітинах під впливом гіпертонії, залишаються актуальними як для теоретичної, так і прикладної кріобіології.

Ще в ранніх кріобіологічних роботах [25] зроблено висновок про суттєвий вплив часу

Studying the causes and mechanisms of sensibility either increase of cell resistance to cooling and, particularly, hypertonicity effect on cells are known to be one of the key problems in cryobiology. Such an effect is realized in cryobiological processes in various aspects: hypertonic lysis (HL), posthypertonic lysis (PHL) and hypertonic cryohemolysis (HC). Under certain conditions these factors may significantly affect the cryopreservation outcome. Studying the processes occurring in cells under hypertonicity effect therefore still remains to be actual both for theoretical and applied cryobiology.

Earlier cryobiological studies [25] proved a considerable effect of cells exposure time in hypertonic

Адреса для кореспонденції: Гордієнко О.І., Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015; тел.: +38 (057) 373-38-71, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Gordiyenko O.I., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3871, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

експозиції клітин у гіпертонічному розчині на їх виживання. Вплив швидкостей охолодження пов'язували з тривалістю дії гіпертонії і з витоком катіонів із клітин. У роботі [32] показано, що час експозиції еритроцитів у гіпертонічних умовах впливає на їх чутливість до наступного охолодження, яка є найбільшою при 5-хвилинній експозиції клітин у гіпертонічному розчині NaCl при 25°C. За даними роботи [26], чутливість еритроцитів до ГК також падає в міру збільшення тривалості впливу гіпертонії, починаючи з 5 хв. Чим вище температура цього впливу, тим швидше зменшується чутливість до ГК. Якщо клітини експонувалися в розчинах NaCl різних осмолярностей протягом 5 хв при 37°C, а потім охолоджувалися до 0°C зі швидкістю 60°C/хв, гемоліз починався при концентрації 1400 мОсм, досягавши максимуму при 1800 мОсм і поступово зменшувався при більш високих концентраціях позаклітинного розчину. Гемоліз за рахунок охолодження знижувався до нуля при осмолярності позаклітинного розчину 4000 мОсм (25%-й гемоліз, що спостерігається при цій концентрації, викликаний тільки контактом з гіпертонічним середовищем).

Зі збільшенням тривалості експозиції еритроцитів у гіпертонічних розчинах NaCl до декількох хвилин час наступного за цією експозицією гіпотонічного гемолізу у водному розчині проникаючої речовини (гліцерину) значно зменшується в порівнянні з нульовою тривалістю експозиції [10]. При цьому після експозиції в помірно гіпертонічних розчинах (0,4 і 0,8М NaCl) час наступного гіпотонічного гемолізу повільно відновлюється (у 0,4М NaCl до вихідної величини) при подальшому збільшенні часу попередньої експозиції. Після витримки в більш гіпертонічних розчинах (1,2 і 2,0М NaCl) час наступного гіпотонічного гемолізу поступово зменшується у всьому діапазоні досліджених часів експозиції (до 30 хв).

Таким чином, аналіз літератури показує, що явища як ПГЛ, так і ГК мають часові особливості та характеризуються максимальною виразністю при експозиції 5-10 хв. Збільшення часу витримки в гіпертонічних розчинах на першій стадії ГК приводить до зменшення ефекту. Наявність часової залежності ГК від тривалості попередньої експозиції клітин у гіпертонічному розчині в діапазоні 5-10 хв пов'язують з латеральним перерозподілом мембранних компонентів [4, 5, 10]. Зниження чутливості клітин до ГК при подальшому збільшенні часу їхньої попередньої експозиції в гіпертонічному розчині пояснюють перерозподілом катіонів калію і натрію між клітиною і навколишнім середовищем унаслідок збільшення пасивної проникності мембран еритроцитів для них при дії

solution on their viability. Effect of cooling rates was thought to be associated with the duration of hypertonicity effect and cations outflux out of cells. The work [32] demonstrates that erythrocytes exposure time under hypertonic conditions influences their sensitivity to the following cooling, which is the highest at 5-min cell exposure in hypertonic NaCl solution at 25°C. According to the paper [26], erythrocytes sensitivity to HC is also falling along with the increase of hypertonicity time starting from 5 min. The higher temperature of the effect is, the quicker the HC-sensitivity is falling. When the cells were 5 min exposed at 37°C in NaCl solutions of different osmolarities and cooled afterwards down to 0°C with the rate of 60°C/min, hemolysis started at concentration equal to 1400 mOsm and reached the maximum at 1800 mOsm and gradually decreased at higher concentrations of extracellular solution. Due to cooling hemolysis reduced down to zero at osmolality of extracellular solution of 4000 mOsm (25% hemolysis, observed at this concentration caused by the contact with hypertonic medium only).

Along with the exposure duration increase for erythrocytes under NaCl hypertonic solutions up to a few minutes the time of following this exposure hypotonic hemolysis exposure in aqueous solution of a permeating substance (glycerol) greatly decreases comparing to "zero" exposure [10]. In this case following the exposure in moderately hypertonic solutions (0.4 and 0.8 M NaCl) time of further hypotonic hemolysis is slowly reaching the initial value in 0.4 M NaCl at the following increase of previous exposure time. After keeping in more hypertonic solutions (1.2 and 2.0 M NaCl) time of following hypotonic hemolysis is gradually decreasing within the whole range of investigated exposure time (up to 30 min).

Analysis of literature data thus demonstrates that both phenomena of PHL and HC have time peculiarities and are characterized by the maximum manifestation at a 5-10 min exposure. Increase of the exposure time in hypertonic solutions at the 1st stage of HL causes lessening of the effect. Time dependence of HL upon the duration of preliminary cell exposure in hypertonic solution in a 5-10 min range is thought to be related to lateral re-distribution of membrane components [4, 5, 10]. Reduction of cell sensitivity to HL at the following time increase of their preliminary exposure under hypertonic solution is explained by potassium and sodium cations re-distribution between a cell and a surrounding medium due to the increase of passive erythrocytes membrane permeability for these substances under the effect of hypothermia, especially at the concentrations exceeding 1800 mOsm [25, 27, 28].

The papers [12-14, 20] demonstrate that erythrocytes exposure in moderately hypertonic solutions

гіпертонії, особливо при концентраціях, що перевищують 1800 мОсм [25,27,28].

У роботах [12-14, 20] показано, що експозиція еритроцитів в помірно гіпертонічних розчинах (0,4-0,45 М NaCl) підвищує їх стійкість до ГЛ (в 3-4 М розчинах NaCl) та ГК. Проте при вивченні зазначеного феномену було приділено недостатньо уваги дослідженню часової залежності цього явища. У більшості робіт час експозиції не варіювався і становив 2 хв. У роботі [14] показано, що резистентність еритроцитів до ГЛ падає зі збільшенням часу експозиції в 0,8 М розчині NaCl до 5 хв, але не досліджено малі (0,5-2 хв), а також більш тривалі експозиції (принаймні до 30 хв). У роботах [3, 14, 22] досліджуються ситуації, що відрізняються як за часом, так і за концентрацією середовища експозиції.

Мета роботи – дослідження впливу часу експозиції еритроцитів людини в гіпертонічних розчинах NaCl (0,4; 0,8; 1,2; 2,0 моль/л) від 30 с до 30 хв на щільність їх розподілу за індексом сферичності в популяції і на витік іонів калію з клітин.

Матеріали і методи

У роботі використано еритроцити донорської крові людини, отриманої на консервуючому розчині “Глюгіцир”.

Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності визначали розробленим нами способом [6, 23]. Індексом сферичності еритроцита P називається відношення максимально можливого при заданій площі поверхні S_0 об'єму клітини V_m до дійсного значення її об'єму V_0 : $P=V_m/V_0$. Оскільки максимальний об'єм при заданій площі поверхні має сфера радіуса

$$R_s = \sqrt{\frac{S_0}{4\pi}},$$

$$\text{то } V_m = \frac{4}{3}\pi R_s^3 = \frac{1}{6\sqrt{\pi}} S_0^{3/2}.$$

Таким чином, індекс сферичності еритроцита в початковому стані

$$P_0 = \frac{1}{6\sqrt{\pi}} \frac{S_0^{3/2}}{V_0}.$$

Частку клітин, що прогемолізували, у залежності від осмотичного тиску гіпотонічного позаклітинного розчину π^{out} (фактично криві осмотичної крихкості) визначали методом малокутового розсіювання світла [6]. Вимірюючи кількість клітин, що зазнали гемолізу, у низці гіпотонічних розчинів NaCl одержували криву осмотичної крихкості, тобто криву в координатах

$$\frac{N_r}{N}(\pi^{\text{out}}),$$

(0.4-0.45 М NaCl) increases their HL resistance (in 3-4 М NaCl solutions) and HC. However while studying the phenomenon not too much attention is paid to investigation of its time dependence. In most of the works exposure time did not vary and made 2 min. Erythrocytes' resistance to HL was shown to fall [14] with the exposure time increase in 0.8 М NaCl up to 5 min, although short exposures (0.5-2 min), as well as the more prolonged ones (up to 30 min) had not been studied yet. The papers [3, 14, 22] study the situations, which differ both on time and exposure medium concentration.

Studying the time effect (from 30 sec to 30 min) of human erythrocytes exposure in NaCl hypertonic solutions (0.4; 0.8; 1.2; 2.0 mol/l) on their distribution density by the sphericity index in the population and potassium ions outflux out of cells was the aim of the work.

Materials and methods

Human donor's blood erythrocytes in “Glugitsyr” preserving solutions were used in the work.

Density of erythrocytes distribution by the sphericity index was determined by the elaborated by us method [6, 23]. Sphericity index of P erythrocytes is the ratio of maximally possible at given S_0 surface square of cell volume V_m to its actual volume value V_0 : $P=V_m/V_0$. As the maximum volume at a given surface square has the sphere with the radius

$$R_s = \sqrt{\frac{S_0}{4\pi}},$$

$$\text{then } V_m = \frac{4}{3}\pi R_s^3 = \frac{1}{6\sqrt{\pi}} S_0^{3/2}.$$

Thus the erythrocyte sphericity index in initial state made

$$P_0 = \frac{1}{6\sqrt{\pi}} \frac{S_0^{3/2}}{V_0}.$$

Part of hemolyzed cells was determined by small angle light scattering method [6] depending on the osmotic pressure of hypotonic extracellular solution, π^{out} (practically osmotic fragility curves). By measuring the number of hemolyzed cells in the series of hypotonic NaCl solutions we obtained the osmotic fragility curve, i.e. the curve in coordinates

$$\frac{N_h}{N}(\pi^{\text{out}}),$$

where N_h was the amount of hemolyzed cells; N was total number of erythrocytes.

By transformation of coordinates along the abscissa axis $\pi^{\text{out}} \rightarrow x$, where

$$x = \alpha + \frac{\pi_0^{\text{in}}(1 - \alpha)}{\pi^{\text{out}}}$$

де N_r – кількість клітин, що зазнали гемолізу; N – повна кількість еритроцитів. Перетворюючи координати вздовж осі абсцис $\pi^{\text{out}} \rightarrow x$, де

$$x = \alpha + \frac{\pi_0^{\text{in}}(1 - \alpha)}{\pi^{\text{out}}}$$

(α – об'ємна частка гемоглобіну в еритроциті, π_0^{in} – осмотичний тиск фізіологічного розчину) і вздовж осі ординат

$$\frac{N_r}{N} = h_p(p < x)$$

(де $h_p(p < x)$ – імовірність того, що індекс сферичності еритроцита P в досліджуваній популяції клітин не перевищує значення x), одержували функцію розподілу еритроцитів у початковій суспензії за індексом сферичності. Диференціюючи цю функцію по x , визначали шукану щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності.

Витік калію з еритроцитів визначали, вимірюючи активність позаклітинного калію в суспензії еритроцитів у часі за допомогою високоселективного калієвого електрода, виготовленого на основі пластифікованої мембрани, що містить валіноміцин. Електрод калібрували до і після вимірювання в розчинах хлористого калію на експериментальному розчині в діапазоні від 0,5 до 20 ммоль K^+ /л [7].

Результати дослідження

Дослідження пасивного витоку іонів калію з еритроцитів, вміщених у гіпертонічний розчин, показали, що у 0,4 М розчині NaCl концентрація іонів калію в позаклітинному середовищі практично не змінюється після 30-хвилинної експозиції (0,075 мМ). Це відповідає виходу 0,5% внутрішньоклітинного калію при 10%-му гематокриті.

При вміщенні еритроцитів у 0,8 М розчин NaCl їх проникність для іонів калію збільшується більш, ніж у 4 рази (таблиця). Вміст позаклітинного калію при витримці в цьому розчині стає помітним вже в перші 10 хв експозиції, через 30 хв з клітин виходить близько 17% внутрішньоклітинного калію.

Подальше збільшення концентрації NaCl в позаклітинному середовищі приводить до істотного зростання проникності для іонів калію: у 30 разів у 1,2 М і більш ніж у 300 разів у 2 М розчині NaCl (таблиця). Витік калію стає суттєвим чинником, що визначає стан еритроцитів у таких середовищах уже на перших хвилинах експозиції. Криві росту концентрації позаклітинного калію виходять на насичення вже до 30-ї хвилини в 1,2 М і до 10-ї хвилини в 2 М розчині NaCl (рис. 1). Рівень позаклітинного калію при цьому відповідає виходу 34% в 1,2 М та 70% внутрішньоклітинного калію в 2 М розчині NaCl.

(α is volumetric part of hemoglobin in erythrocyte; π_0^{in} is osmotic pressure of physiological solution) and along the ordinate axis

$$\frac{N_r}{N} = h_p(p < x)$$

($h_p(p < x)$ is probability of the fact that erythrocyte sphericity index, P , in the studied cell population does not exceed the x value), we got the erythrocytes distribution function in an initial suspension by the sphericity index. By differentiating the x function we defined the unknown erythrocytes distribution density by the sphericity index.

Potassium outflux out of erythrocytes was determined by measuring the activity of extracellular potassium in erythrocytes suspension in time using highly-selective potassium electrode prepared on the base of valinomycin-containing plastified membrane. Electrode was adjusted prior to and following the measuring in potassium chloride solutions in experimental solution within the range of 0.5 to 20 mmol of K^+ per liter [7].

Results and discussion

Studying of potassium ions passive outflux out of erythrocytes placed into hypertonic solution showed that in 0.4 M NaCl solution potassium ions concentration in extracellular medium did not practically change after a 30 min exposure (0.075 mM). This is consistent with the outflux of 0.5% intracellular potassium at 10% hematocrite.

When erythrocytes are placed into 0.8 M NaCl solution their permeability for potassium ions increases by more than 4 times (Table). Extracellular potassium content during this solution exposure is already visible at first 10 min of exposure, in 30 min about 17% of intracellular potassium is leaving the cells.

Further increase of NaCl concentration in an extracellular medium results in a considerable permeability increase for potassium ions: in 30 times in 1.2 M and

Витік іонів калію з клітин (J_k , моль/с) і коефіцієнти проникності мембран еритроцитів (P_k , см/с) у гіпертонічних розчинах NaCl

Potassium ions outflux out of cells (J_k , mol/sec) and permeability coefficients of erythrocyte membranes (P_k , cm/sec) in NaCl hypertonic solutions

$[C_{Na}], \text{ моль/л}$ $[C_{Na}], \text{ mol/l}$	$J_k \cdot 10^{18}, \text{ моль/с}$ $J_k \cdot 10^{18}, \text{ mol/s}$	$P_k \cdot 10^7, \text{ см/с}$ $P_k \cdot 10^7, \text{ cm/s}$
0,4	0,035	0,008
0,8	1,42	0,034
1,2	10,7	0,25
2,0	109,7	2,6

Експозиція в помірно гіпертонічних розчинах, яка не викликає значного витоку іонів калію з клітин, не приводить до зсуву максимуму розподілу еритроцитів за індексом сферичності у фізіологічному розчині після експозиції в гіпертонічних розчинах NaCl. Проте форма кривих щільності розподілу змінюється в залежності від часу експозиції клітин у гіпертонічних розчинах, особливо в діапазоні малих індексів сферичності (рис. 2, 3). Вже в перші 30-60 секунд експозиції істотно зменшується кількість клітин у діапазоні індексів сферичності 1,0-1,3 (рис. 2). Суттєві зміни кривих щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності спостерігаються також при збільшенні тривалості експозиції до 3-10 хв. У ці часи експозиції в інтервалі малих індексів сферичності (1,0-1,3) з'являються додаткові максимуми щільності розподілу, тобто збільшується кількість клітин з меншими індексами сферичності (рис. 3). При подальшому збільшенні часу експозиції до 20-30 хв щільність клітин у цьому інтервалі індексів сферичності знову зменшується і стабілізується на деякому визначеному для кожного донора рівні. Характер зміни щільності розподілу еритроцитів у діапазоні малих індексів сферичності в залежності від часу експозиції клітин у гіпертонічному сольовому розчині аналогічний для різних донорів, хоча щільність розподілу відрізняється кількісно і залежить від початкової частки клітин у цьому діапазоні індексів сферичності. Так, для донора 3, що має у вихідному стані найбільшу кількість клітин у діапазоні індексів сферичності 1,0-1,3 у порівнянні з іншими донорами, максимум в інтервалі 3-10 хв експозиції є найбільш вираженим; для донора 1, що має у вихідному стані найменшу кількість клітин у цьому діапазоні, він найменший.

Аналогічна залежність для частини клітин у діапазоні індексів сферичності 1,0-1,3 від часу

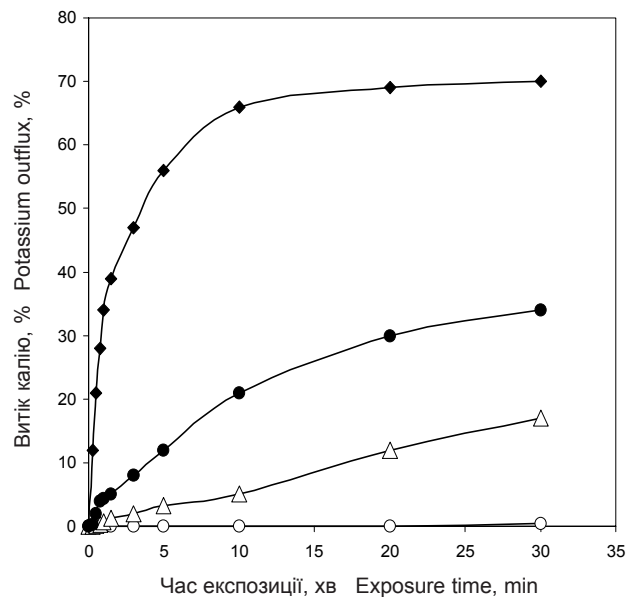


Рис. 1. Витік калію (% від внутрішньоклітинного) з еритроцитів при їх експозиції в гіпертонічних розчинах NaCl: ○ – 0,4 М; △ – 0,8 М; ● – 1,2 М; ◆ – 2,0 М.

Fig. 1. Potassium outflux (% of intracellular content) out of erythrocytes during the exposure in NaCl hypertonic solutions: ○ – 0.4 M; △ – 0.8 M; ● – 1.2 M; ◆ – 2.0 M.

more than 300 times in 2 M NaCl solution (Table). Potassium outflux is an important factor determining the erythrocytes state in such media already at first minutes of exposure. Concentration rise curves of extracellular potassium reach the saturation already to the 30th minute in 1.2 M and to the 10th min in 2 M NaCl solution (Fig. 1). Level of extracellular potassium thereat corresponds to the outflux of 34% of intracellular potassium in 1.2 M and 70% in 2 M NaCl solution.

Exposure in moderately hypertonic solutions which does not result in a significant potassium ions outflux out of cells, does not cause the maximum shift of erythrocytes distribution by the sphericity index in physio-

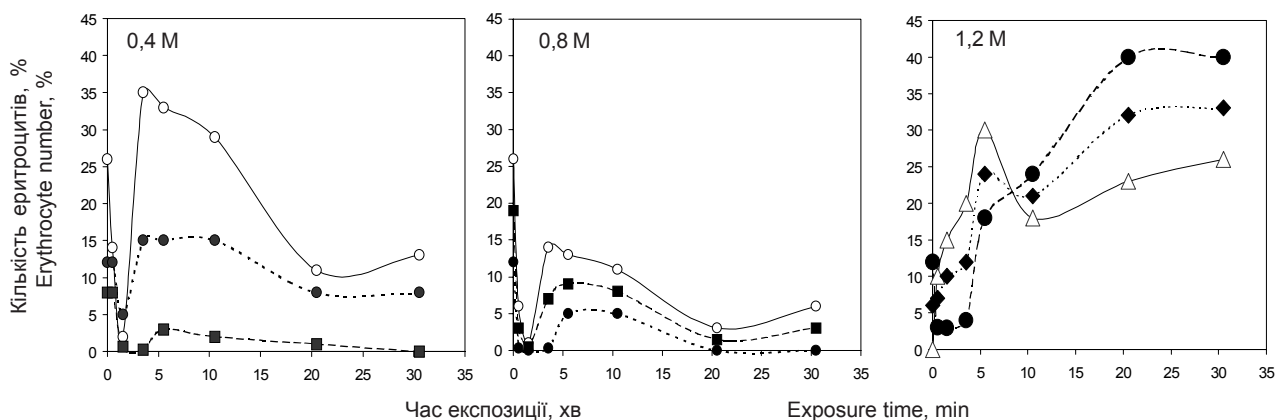


Рис. 2. Залежність частки еритроцитів (%) у діапазоні індексів сферичності 1,0-1,3 від часу попередньої експозиції в гіпертонічних розчинах NaCl: ■ – 1-й донор; △ – 2-й донор; ○ – 3-й донор; ● – 4-й донор; ◆ – 5-й донор.

Fig. 2. Dependence of erythrocytes part (%) within the sphericity indexes range of 1.0-1.3 upon preliminary exposure time in NaCl hypertonic solutions: ■ – 1st donor; △ – 2nd donor; ○ – 3-rd donor; ● – 4th donor; ◆ – 5th donor.

експозиції спостерігається після витримки в 0,8 М розчині NaCl (див. рис. 2). Максимуми в цьому випадку є меншими за абсолютною величиною, але відповідають 3-10 хв експозиції. Як і у випадку експозиції в 0,4 М розчині NaCl, на кривих щільності розподілу за індексом сферичності з'являються додаткові максимуми за часів експозиції 3-10 хв, що зникають при 20-хвилинній експозиції (рис. 4).

Збільшення концентрації NaCl в середовищі експозиції до 1,2 М приводить до якісно інших результатів. Хоча на кривих залежності частки клітин у діапазоні індексів сферичності 1,0-1,3 від часу експозиції все ще спостерігаються особливості при експозиції 3-10 хв, подальше збільшення часу експозиції в цьому розчині приводить до

logical solution following the exposure in NaCl hypertonic solutions. However the shape of density distribution curves is changing depending on cell exposure time in hypertonic solutions, especially within the range of small sphericity indexes (Fig. 2, 3). Even at first 30-60 seconds of exposure the cell amount decreases considerably within the range of 1.0-1.3 sphericity indexes (Fig. 2). Considerable changes in density distribution curves according to the sphericity index are also observed when increasing the exposure duration up to 3-10 min. At this exposure time within the range of small sphericity indexes (1.0-1.3) there appear some extra maximums of the distribution density, *i.e.* cell amount with lower sphericity indexes increases (Fig. 3). At further increase of the exposure time up to 20-

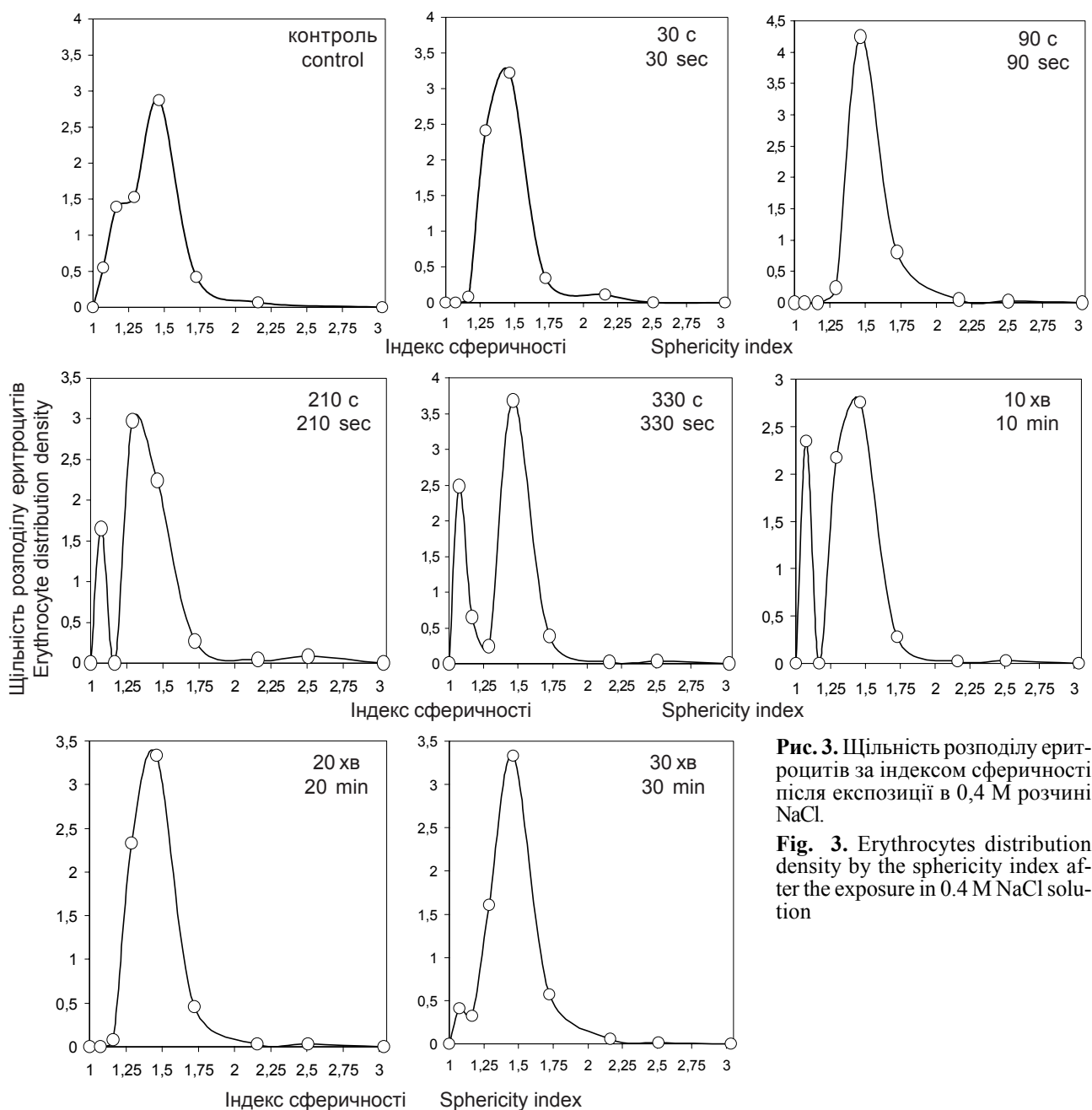


Рис. 3. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності після експозиції в 0,4 М розчині NaCl.

Fig. 3. Erythrocytes distribution density by the sphericity index after the exposure in 0.4 M NaCl solution

істотного росту щільності клітин в інтервалі малих індексів сферичності (див. рис. 2). На кривих щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності після експозиції в 1,2 М розчині NaCl видно, що додатковий максимум, який з'явився в діапазоні малих індексів сферичності, вже не зникає при збільшенні часу експозиції до 30 хв (рис. 5).

Експозиція еритроцитів у 2 М розчині NaCl, що викликає значний витік калію з клітин, приводить також і до швидкого зростання частини сферичних клітин при наступному вміщенні їх у ізотонічне середовище. Уже через 30 секунд експозиції щільність розподілу клітин за індексом сферичності істотно відрізняється від контрольного розподілу

30 min cell density within this intervals range is falling again and was found to get stabilized at a certain for each donor level. Character of the distribution density change within the range of small sphericity indexes depending on cell exposure time in saline hypertonic solution is the same for different donors, though the distribution density is quantitatively different and depends upon the initial cell number within this range of sphericity indexes. For donor 3 who has the highest cell amount in an initial state within the sphericity indexes range of 1.0-1.3 comparing to other donors the maximum in the interval of 3-10 min of exposure is the most manifested; for donor 1 with the lowest cell amount in the initial state it is the lowest within this range.

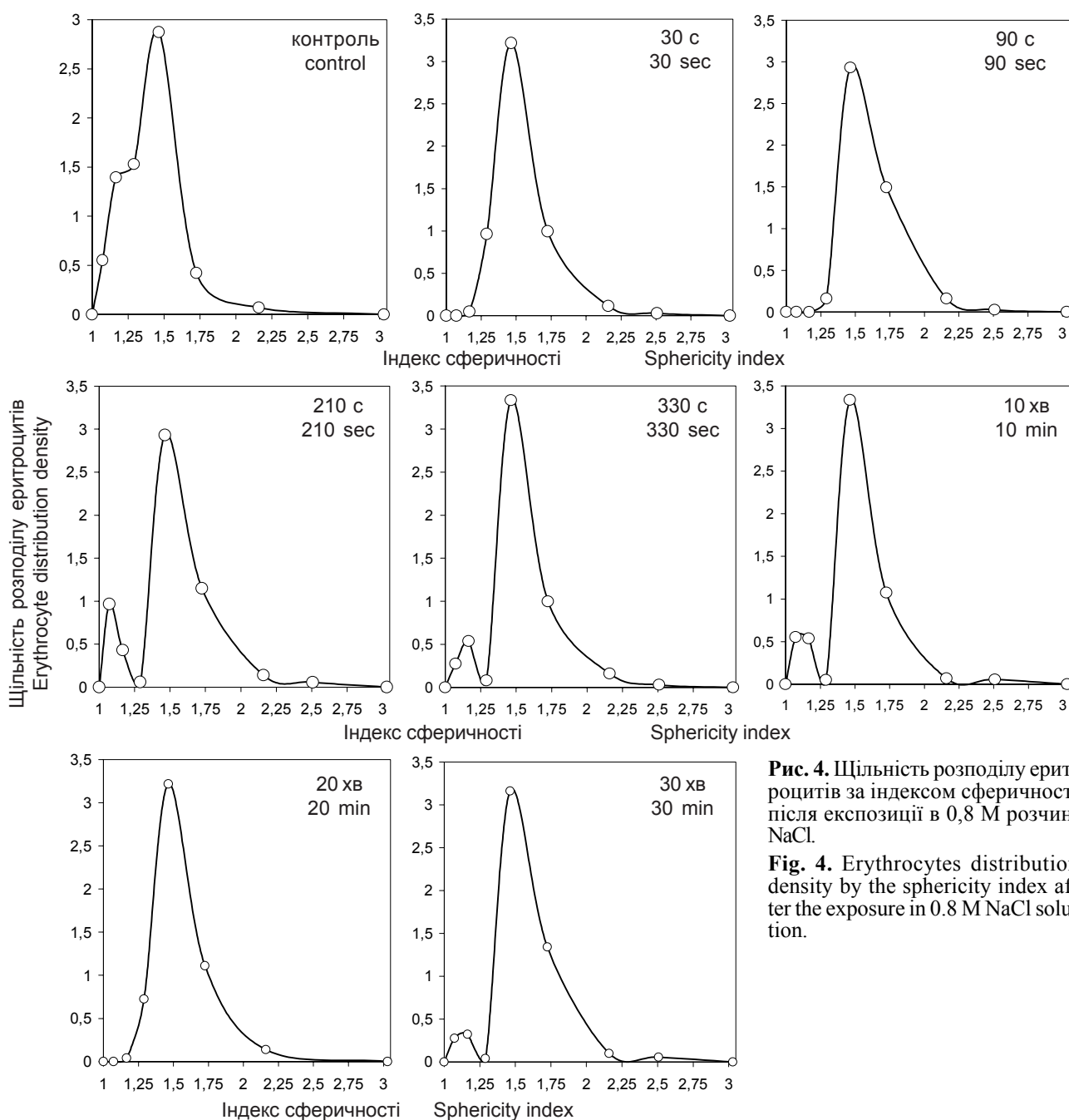


Рис. 4. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності після експозиції в 0,8 М розчині NaCl.

Fig. 4. Erythrocytes distribution density by the sphericity index after the exposure in 0.8 M NaCl solution.

(рис. 6). Частина клітин у діапазоні індексів сферичності 1,0-1,3 складає велику частину популяції еритроцитів: 58% через 30 секунд і 70% через 90 секунд експозиції. При збільшенні часу експозиції частка сферичних клітин ($P=1$) зростає і досягає 90% уже при 10-хвилинній експозиції (рис.7).

Дослідження впливу гіпертонії на розподіл еритроцитів за індексом сферичності показали, що стан їх популяції після гіпертонічного впливу залежить як від ступеня гіпертонії, так і від часу впливу. Звертає на себе увагу різке зменшення кількості клітин з малим індексом сферичності після

Analogous dependence of some cells within the sphericity index range of 1.0-1.3 upon the exposure time is observed after keeping them in 0.8 M NaCl solution (see Fig. 2). Maximums in this case are lesser according to the absolute value, though they correspond to 3-10 minutes of exposure. The same as in the case of exposure in 0.4 M NaCl in the density distribution curves by the sphericity index there appear the extra maximums during a 3-10 min exposure, disappearing at 20-min exposure (Fig. 4).

Rise of NaCl concentration in the exposure medium up to 1.2 M results in qualitatively different outcomes. Although in the dependence curves of some cells within

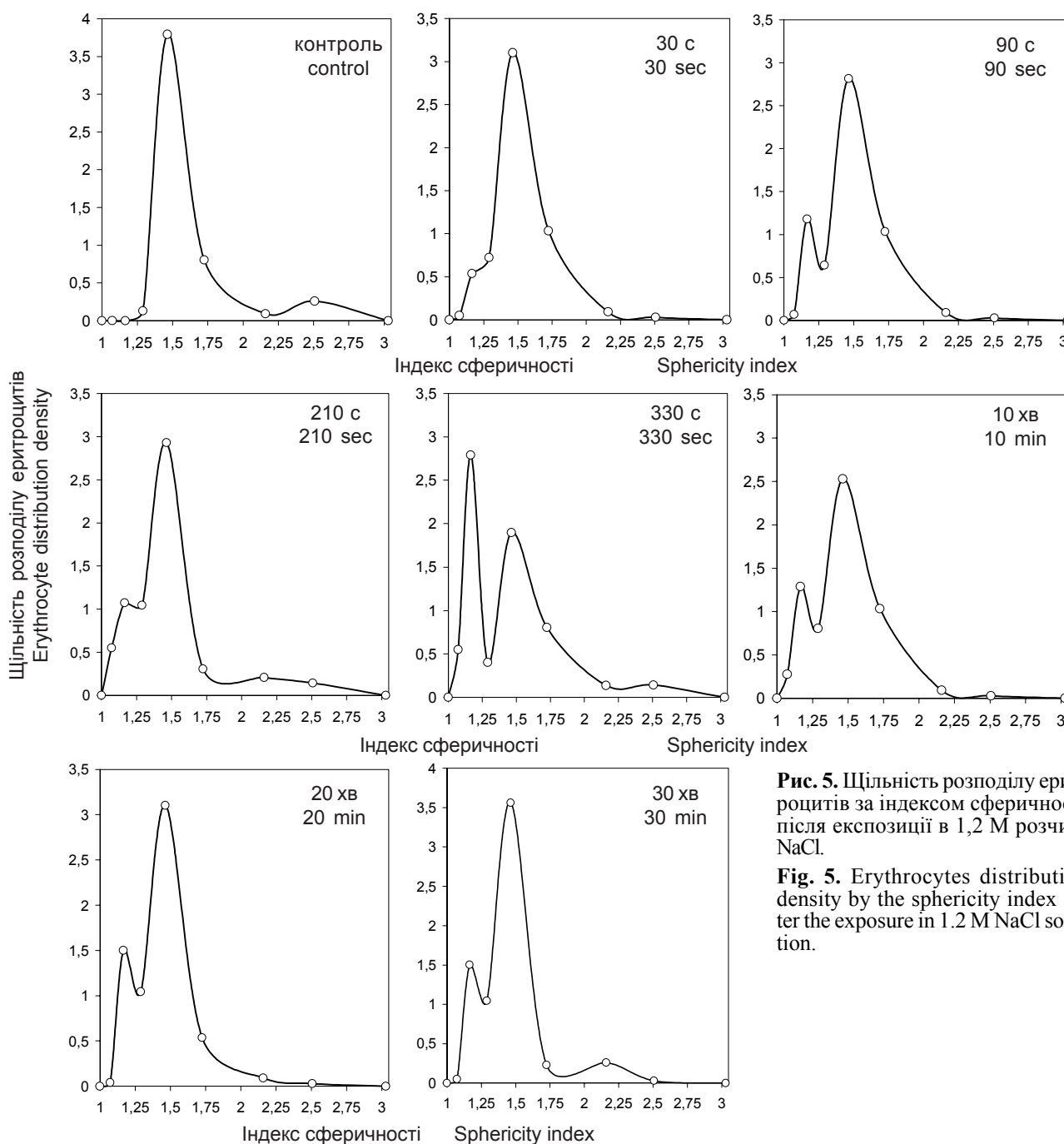


Рис. 5. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності після експозиції в 1,2 М розчині NaCl.

Fig. 5. Erythrocytes distribution density by the sphericity index after the exposure in 1.2 M NaCl solution.

перших 30-90 секунд експозиції в 0,4 і 0,8 М розчинах NaCl (див. рис. 2). У зв'язку з високою проникністю мембран еритроцитів для води [8, 24] одним з основних чинників, що впливають на них у перші секунди експозиції в гіпертонічному середовищі, є зневоднювання клітин і пов'язана з цим деформація клітинної мембрани, а також підвищення іонної сили як позаклітинного, так і внутрішньоклітинного середовища. Відомо, що важливу роль у підтримці форми еритроцитів відіграє білковий каркас, розташований на цитоплазматичній поверхні їх мембран [21]. У роботі [1] підкреслюється, що тривимірні мережі цитоскелетних білків можна розглядати як центральний механізм, що забезпечує стабільність або нестабільність клітин при охолодженні і заморожуванні. Найвні численні дані про взаємозв'язок форми еритроцитів і взаємодію цитоскелета з мембраною за допомогою контактів цитоскелета з білком смуги 3 через анкирин (білок 2.1) і білок 4.1 [29, 30]. Існують також більш слабкі взаємодії між спектрином і фосfolіпідами мембрани, що стабілізують ліпідний бішар і підтримують його асиметрію [21]. Висловлено припущення [13, 14], що збільшення резистентності еритроцитів до ГЛ (у 4 М розчині NaCl) після нетривалої (до 2 хв) попередньої інкубації в розчинах NaCl з концентрацією 0,4-0,45 моль/л пов'язано зі змінами взаємодії цитоскелета з мембраною. Стійкість клітин до переносу в середовища з високим вмістом електроліту в значній мірі визначається характером асоціації-дисоціації білка смуги 3 з цитоскелетом [9,

the range of 1.0-1.3 sphericity indexes, the peculiarities at 3-10min exposure are still being observed, the further exposure time rise in this solution causes a considerable cell density growth within small sphericity indexes (See Fig. 2). Density distribution curves of erythrocytes on the sphericity indexes after the exposure in 1.2 M NaCl show the extra maximum which appears within the range of small sphericity indexes, does not disappear when increasing the exposure time up to 30 min (Fig. 5).

Erythrocytes exposure in 2 M NaCl solution, which results in a considerable potassium outflux out of cells, also causes a rapid increase of the amount of spherical cells when placed then into an isotonic medium. Even in a 30 sec exposure the cell distribution density on the sphericity index dramatically differs from the control value (Fig. 6). Some cells within the sphericity index range of 1.0-1.3 make a significant part of erythrocytes population: 58% in 30 seconds and 70% in 90 seconds of exposure. When increasing the exposure time amount of spherical cells (P=1) increases and reaches 90% already at 10-min exposure (Fig. 7).

Studying of hypertonicity effect on erythrocytes distribution by the sphericity index showed the state of their population to depend following the hypertonic effect both on the hypertonicity degree and effect duration. A sharp fall of cell number with a small sphericity index after first 30-90 seconds of exposure in 0.4 and 0.8 M NaCl is evident (see Fig. 2). Because of a high water permeability of erythrocytes membranes [8, 24] cell dehydration and resulted from it cell membrane deformation, as well as ionic force

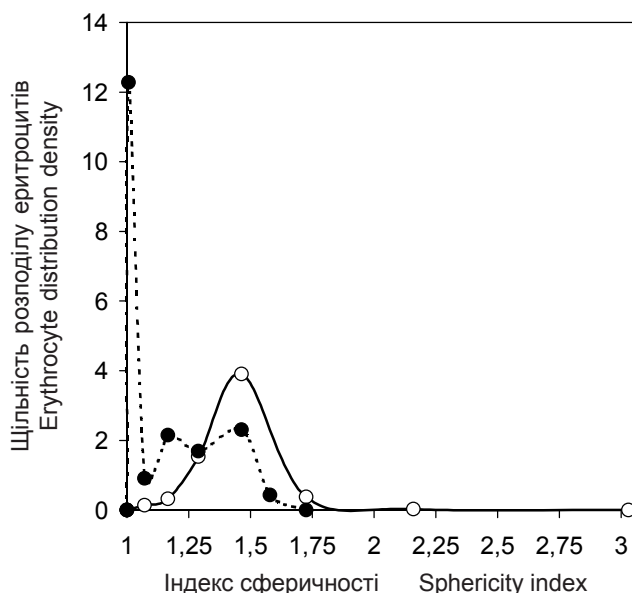


Рис. 6. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності у нативній популяції та після експозиції в 2 М розчині NaCl: ○ – контроль; ● – 30 с.

Fig. 6. Erythrocytes distribution density by the sphericity index in the native population and after the exposure in 2 M NaCl solution: ○ – control; ● – 30 s.

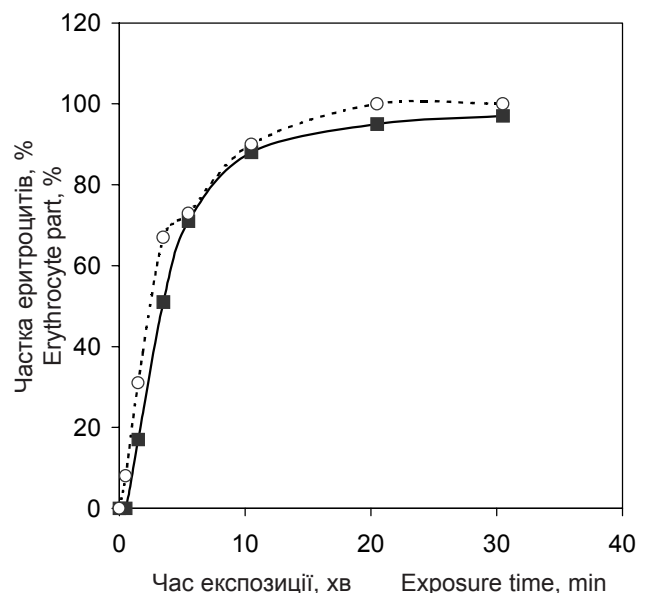


Рис. 7. Залежність частки сферичних еритроцитів від часу попередньої експозиції в 2 М розчині NaCl: ■ – 3-й донор; ○ – 4-й донор.

Fig. 7. Dependence of the number of spherical erythrocytes on preliminary exposure time in 2 M NaCl solution: ■ – 3rd donor; ○ – 4th donor.

14, 17]. Автори припускають, що основну роль у цьому явищі відіграє зміна структурного стану комплексу “мембрана-цитоскелет” при зневоднюванні через зростання щільності розподілу структурних елементів цитоскелета, впливаючи на ступінь їх взаємодії з мембраною. У роботі [2] підкреслюється, що, оскільки цитоскелетна мережа еритроцитів стабілізується нековалентними зв'язками, її топологія суттєво визначається умовами навколишнього середовища і саме гелева природа цитоскелета виводить на перший план такі фактори, як осмотичний тиск, іонна сила, рН і температура. Морфологічно це проявляється в кренуванні еритроцитів, а в структурному плані – у зміні характеру асоціації спектринової мережі з мембраною. Численні дослідження впливу різних речовин, що модифікують взаємодію цитоскелета з мембраною, на гіпертонічну і холододову чутливість еритроцитів показали обґрунтованість такого пояснення. М'яка обробка еритроцитів геміном, що вільно проникає крізь ліпідний бішар і зв'язується з білком 4.1, порушуючи нативну структуру цього білка і його зв'язок із спектрином, приводить до зниження рівня гіпертонічного шоку [18]. Результати роботи [15] показали, що дія інгібітору аніонного транспорту ДІДС на холододову й осмотичну чутливість еритроцитів пов'язана з його впливом на взаємодію білка смуги 3 з цитоскелетом [30]. У роботі [16] зазначено, що дія ДІДС на чутливість еритроцитів до гіпертонічного шоку обумовлена модифікацією не тільки зв'язку білка смуги 3 з цитоскелетом, але й взаємодією білка смуги 4.1 у мембрані. Ці ж взаємодії, на думку авторів роботи [11], відповідальні за стійкість еритроцитів до ПГЛ. При дослідженні впливу обробки еритроцитів протеолітичними ферментами та ДІДС автори роботи [19] також прийшли до висновку, що на розвиток чутливості еритроцитів до холододового шоку впливає модифікація взаємодії білка смуги 3 з білками цитоскелета. Така модифікація може бути опосередкована мінорними інтегральними білками, чутливими до обробки трипсином і проназою.

Таким чином, різке зменшення частки клітин з малим індексом сферичності при поверненні їх у ізотонічне середовище після перших 30-90 секунд експозиції в 0,4 М розчині NaCl, отримане в нашому експерименті, корелює з підвищенням резистентності як до наступного ГЛ [14, 17, 18], так і до ГК [2, 15, 16]. За даними [10], еритроцити, витримані в гіпертонічних умовах менше 1 хв, стійкі до ушкодження температурним шоком, потім стійкість клітин знижується до мінімального значення при 5-хвилинній експозиції у гіпертонічному розчині NaCl і підвищується при більш тривалій експозиції (від 5 до 50 хв). Така зміна чутливості клітин до

increase in both extra- and intracellular media are known to be one of the main factors affecting them at first seconds of hypertonic medium. Protein skeleton located on a cytoplasm surface of erythrocyte membranes is known to be of importance in maintaining the erythrocytes shape [21]. The work [1] underlines that three-dimension nets of cytoskeletal proteins could be considered as the central mechanism providing the stability either non-stability of cell while cooling and freezing. Numerous data are available on the interaction of erythrocytes shape and cytoskeleton-membrane bond by cytoskeleton contacts with band 3 protein via ankyrins (protein 2.1) and protein 4.1 [29, 30]. There are also weaker interactions between spectrine and membrane phospholipids, which stabilize lipid bilayer and maintain its asymmetry [21]. There is a supposition [13, 14] that the increase of erythrocytes resistance to HL (in 4 M NaCl) after a short-term (up to 2 min) preliminary incubation in 0.4-0.45 mol/l NaCl solutions is associated with the changes in cytoskeleton-membrane interactions. Cell integrity to the transfer into the media of high electrolyte content is greatly determined by the character of band-3 protein association-dissociation with cytoskeleton. The authors presume the main role in this phenomenon belongs to the change in structural state of “membrane-cytoskeleton” complex during dehydration by increasing the distribution density of cytoskeleton structural elements by affecting the degree of their interaction with membrane. The work [2] shows that as the erythrocytes net of cytoskeleton is stabilized by non-covalent bonds, its topology is greatly predetermined by the environment conditions and namely the gel nature of cytoskeleton makes such factors as osmotic pressure, ionic force, pH and temperature the most important. Morphologically this is manifested in erythrocytes crening, and structurally – in changing the character of spectrine net association with membrane. Numerous studies of the effect of different substances which modify cytoskeleton interaction with membrane, on erythrocytes hypertonic and cold sensitivity showed reasonability of such an explanation. Soft erythrocytes treatment by hemine, which easily penetrates through lipid bilayer and binds with protein 4.1 by impairing native structure of this protein and its bond with spectrine, causes the decrease in hypertonic shock level [18]. The study results demonstrate [15] that the effect of DIDS anion transport inhibitor on cold and osmotic erythrocytes sensitivity is associated with its effect on band 3 protein interaction with cytoskeleton [30]. In the paper [16] it is referred to that DIDS effect on erythrocytes sensitivity to hypertonic shock is substantiated by modification of not only the band 3 protein bond with cytoskeleton, but also the one of band 4.1 in membrane. The same bonds,

ГК у залежності від часу попередньої інкубації відповідають нашим даним про зміну частки клітин з малим індексом сферичності зі збільшенням часу попередньої інкубації.

Часові характеристики зміни чутливості клітин до наступних критичних впливів, а також характерні часи, при яких спостерігається ріст частки клітин з малим індексом сферичності, після інкубації в гіпертонічних розчинах відповідають часовим характеристикам перерозподілу мембранних компонентів у деформованій плазматичній мембрані. У роботах [4, 5] показано, що деформація клітинної мембрани при зневоднюванні може бути причиною латерального перерозподілу мембранних компонентів. Вільна енергія деформації вигнутого бішару при заданій формі зменшується за рахунок концентрації "м'яких" компонентів, тобто компонентів з меншим модулем розтягу, у ділянках мембрани з більшою кривизною і переміщення більш "твердих" мембранних компонентів у ділянки бішару з меншою кривизною. При цьому форма мембрани в ході латерального перерозподілу її компонентів стає більш гладкою, але все ще кренованою. Латеральний перерозподіл мембранних компонентів є процесом активаційного типу і тому здійснюється за кінцевий проміжок часу, що зменшується з ростом температури і при кімнатній температурі складає близько 6 хв [31]. У роботі [10] проведено візуальне спостереження процесу ГК під світловим мікроскопом. Експерименти підтверджують отримані іншими авторами дані, згідно з якими еритроцити, які перенесено в помірно гіпертонічні розчини NaCl, приймають форму дискоцита, кренованого в тороїдальній частині і сплюсненого в області, розташованій біля осі симетрії. При збільшенні тривалості експозиції до 5-10 хв обриси клітини трохи згладжуються, що автор пов'язує з латеральним перерозподілом мембранних компонентів у мембрані, деформованій внаслідок зневоднювання клітин.

Очевидно, що збільшення частки еритроцитів з малим індексом сферичності при експозиції в 0,4 і 0,8 М розчині NaCl в інтервалі 3-10 хв не пов'язано з витіком калію з клітин. У 0,4 М розчині NaCl витік калію практично не спостерігається аж до 30-ї хвилини експозиції. При експозиції у 0,8 М розчині NaCl, хоча витік калію стає помітним, він є постійним в перші 30 хв експозиції і міг би привести тільки до монотонного зростання кількості клітин з малим індексом сферичності. Результати, що отримано методом визначення щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності, свідчать про особливості стану клітин при експозиції 3-10 хв, що зникають при подальшому збільшенні часу експозиції до 20-30 хв у 0,4 та 0,8 М розчинах NaCl.

the authors suppose [11], are responsible for erythrocytes resistance to PHL. When studying the effect of erythrocytes treatment with proteolytic enzymes and DIDS the authors [19] also conclude that development of erythrocytes sensitivity to cold shock is influenced by modification of band 3 protein interaction with cytoskeleton proteins. Such a modification might be mediated by minor integral proteins sensitive to trypsin and pronase treatment.

Therefore, a sharp decrease of the number of cells with a small sphericity index after returning them into an isotonic medium following the first 30-90 seconds of exposure in 0.4 M NaCl, obtained during our experiment, correlates with both resistance increase to further HL [14, 17, 18] and to HL [2, 15, 16]. According to the data [10], erythrocytes being under hypertonic conditions less than 1 min are resistant to temperature shock damage, then follows the fall of cell integrity down to the minimum value at 5-min exposure in NaCl hypertonic solution and the rise at a more prolonged exposure (5 to 50 min). Such a change of cell sensitivity to HL depending on preliminary incubation duration correlates with our data on the change in cell amount with a small sphericity index along with the increase of preliminary incubation time.

Time characteristics of cell sensitivity changes after further critical effects, as well as the characteristic time at which there is observed the growth of cell amount with a small sphericity index, following the incubation in hypertonic solutions, were found to be consistent with time characteristics of membrane components re-distribution in a deformed plasmatic membrane. The works [4, 5] demonstrate that cell membrane deformation during dehydration could be the cause of lateral re-distribution of membrane components. Free deformation energy of a curved bilayer at a given shape is falling due to the concentration of "soft" components, i.e. those with lower tension module, in the membrane sites with more curvature and migration of more "solid" membrane components into the bilayer sites with less curvature.

Membrane shape thereat during lateral redistribution of its components is getting smoother, but still remains crenated. Lateral redistribution of membrane components is known to be the activation type process and is realized therefore at final period, which is getting shorter along with the temperature rise and makes about 6 min at a room temperature [31]. In the work [10] there was accomplished a visual observation of HC process by light microscope. Experiments confirm the data obtained by other authors that erythrocytes being transferred into moderately hypertonic NaCl solutions, acquire the shape of crenated in thoroidal part discocyte and flattened out in the area close to symmetry axis. Along with the exposure time increase

У випадку 1,2 М розчину NaCl також спостерігається особливість кривої, що відображає частку клітин з малим індексом сферичності за 3-10-хвилинної експозиції. Проте значний витік калію в цьому розчині приводить до подальшого збільшення частки клітин з малим індексом сферичності при збільшенні часу експозиції, що маскує максимум у діапазоні 3-10 хв. Тобто при експозиції еритроцитів у 1,2 М і особливо в 2 М розчині NaCl суттєвий витік внутрішньоклітинного калію стає основним чинником, що впливає на розподіл еритроцитів за індексом сферичності при наступному вміщенні їх у ізотонічне середовище. Крива росту частки сферичних еритроцитів після експозиції в 2 М розчині NaCl (рис. 7), як і крива витоку іонів калію з клітин (див. рис.1), виходить на насичення вже через 10 хв експозиції.

Висновки

У результаті проведених досліджень показано, що при експозиції еритроцитів у гіпертонічних середовищах стан еритроцитів змінюється в залежності від часу експозиції і ступеня гіпертонії середовища. У середовищах з помірною гіпертонією (0,4 і 0,8 М розчинах NaCl) у перші 30-90 секунд експозиції зменшується кількість клітин у діапазоні малих індексів сферичності ($P=1,0-1,3$). Проведений аналіз літературних даних дозволяє припустити, що цей ефект пов'язаний з модифікацією взаємодії мембранного бішару зі спектринним цитоматриксом.

Особливості кривих щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності і кривих, що відбивають частку клітин у інтервалі малих індексів сферичності, в області 3-10 хв експозиції за часовим параметром можна пов'язати з явищем латерального перерозподілу мембранних компонентів у деформованій мембрані.

Наші дані свідчать також про те, що зменшення чутливості клітин до наступного стресового впливу (охолодження, гіпертонічний чи гіпотонічний шок) може бути пов'язано не тільки з витоком катіонів, але й з закінченням латерального перерозподілу компонентів мембрани до 20-30 хв експозиції, особливо при помірній гіпертонії. Очевидно, у період здійснення цього процесу клітини найбільш чутливі до наступних змін умов навколишнього середовища.

Література

1. Белоус А.М. Роль белков цитоскелета в холодовой стабильности клеток // Криобиология. – 1990. – №3. – С. 3-11.
2. Бондаренко В.А., Бондаренко Т.П., Руденко С.В. Эффекты дегидратации в контроле холодовой и осмотической

up to 5-10 min the cell contours become slightly smoothed, which is thought to be associated by the author with lateral membrane components re-distribution in a deformed by dehydration cell membrane.

Augmentation in the amount of erythrocytes with small sphericity index during the exposure in 0.4 and 0.8 M NaCl solution in the interval of 3-10 min is thought to have no association with potassium outflux out of cells. In 0.4 M NaCl potassium outflux is practically not observed up to the 30th minute of exposure. During that in 0.8 M NaCl, potassium outflux is getting visible but it becomes constant at first 30 min of exposure and could result in a monotonous increase of the number of cells with low sphericity index. However the results obtained by measuring the erythrocytes distribution density by the sphericity index, prove the cell state peculiarities at 3-10 min exposure, which disappear at further exposure time increase up to 20-30 min in 0.4 and 0.8 M NaCl.

In 1.2 M NaCl the peculiarity of the curve, representing the cells with a small sphericity index at a 3-10 min exposure, is also seen. However a considerable potassium outflux in this solution causes the further increase of the number of cells with a small sphericity index when the exposure time is increased, that is masking the maximum within the period of 3-10min. This means that during erythrocytes exposure in 1.2 M and especially in 2 M NaCl solution, considerable outflux of intracellular potassium becomes the major factor influencing the erythrocytes distribution by the sphericity index at the following placing them into an isotonic medium. Both the growth curve of the number of spherical erythrocytes following the exposure in 2 M NaCl (Fig. 7), and that of potassium ions outflux out of cells (see Fig. 1) reach the saturation already by 10 min of exposure.

Conclusions

The study performed shows that erythrocytes state is changing at hypertonic media exposure depending on the exposure time and the medium hypertonicity degree. In moderate hypertonicity media (0.4 and 0.8 M NaCl) at first 30-90 seconds of exposure the number of cells within the range of small sphericity indexes ($P=1.0-1.3$) was shown to decrease.

Literature data analysis let us suppose this to be associated with modification of membrane bilayer and spectrine cytomatrix interaction.

Peculiarities in the curves of erythrocytes density distribution by the sphericity index and those illustrating the cells within the range of small sphericity indexes in the interval of 3-10 min of exposure by time parameter could be associated with the phenomenon of lateral re-distribution of membrane components in a deformed membrane.

чувствительности клеток // Пробл. криобиологии.– 1992.– №4.– С. 14-25.

3. *Бондаренко Т.П.* Комбинированное действие температуры и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к гипертоническому стрессу // Пробл. криобиологии.– 1993.– №2.– С. 11-16.
4. *Гордиенко Е.А., Войнова М.В.* Физико-математическая модель латерального перераспределения липидов при изотермической деформации // Криобиология.– 1985.– №3.– С. 43-48.
5. *Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С.* Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий.– Киев: Наук. думка, 1994.– 143 с.
6. *Гордієнко Є.О., Гордієнко О.І., Коваленко І.Ф. та ін.* Фізико-математичний аналіз та експериментальне визначення щільності розподілу еритроцитів донорської і пуповинної крові людини за індексом сферичності // Вісн. Харків. ун-ту. N488. Біофіз. вісн.– 2000.– Вип.6.– С. 75-78.
7. *Гордиенко О.И.* Барьерно-транспортная функция мембран эритроцитов при комбинированном воздействии низких температур и ультразвуковых колебаний: Дис... канд. биол. наук.– Харьков, 1983.– 136 с.
8. *Гордиенко О.И., Емец Б.Г., Жиликова Т.А., Шейкин В.И.* Температурная зависимость водной диффузионной проницаемости мембран эритроцитов в средах с различной ионной силой // Биол. мембраны.– 1985.– Т.2, №3.– С. 310-314.
9. *Дунаевская О.Н., Панталер Е.Р., Шпакова Н.М., Бондаренко В.А.* Некоторые возможности повышения устойчивости эритроцитов к холодовым и осмотическим воздействиям при использовании катионных амфиатов // Пробл. криобиологии.– 1995.– №1.– С. 21-27.
10. *Коваленко С.Е.* Причина и механизм явления гипертонического криогемолиза: Дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1999.– 123 с.
11. *Олейник О.А., Рамазанов В.В., Бондаренко В.А.* Постгипертонический лизис модифицированных эритроцитов в цитратной среде // Пробл. криобиологии.– 2003.– №3.– С. 21-29.
12. *Орлова Н.В.* Влияние амфифильных соединений на осмотическую и температурную чувствительность эритроцитов: Дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 2001.– 142 с.
13. *Поздняков В.В.* Влияние состава и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к осмотическому и температурному шоку: Дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1988.– 121 с.
14. *Поздняков В.В., Бондаренко В.А.* Взаимосвязь между исходными условиями среды и чувствительностью эритроцитов к гипертоническому стрессу в 4 М NaCl // Криобиология.– 1989.– №1.– С. 47-49.
15. *Рамазанов В.В., Бондаренко В.А.* Сравнительное исследование холодового и гипертонического шока эритроцитов в растворе NaCl // Пробл. криобиологии.– 1996.– №1.– С. 34-37.
16. *Рамазанов В.В., Бондаренко В.А.* Действие гемина и ДИДС на холодовой и гипертонический шок эритроцитов // Пробл. криобиологии.– 1996.– №2.– С. 13-17.
17. *Рамазанов В.В., Руденко С.В., Бондаренко В.А.* Влияние модификаторов цитоскелета на чувствительность эритроцитов к гипертоническому шоку при повышении осмолярности среды предынкубации // Пробл. криобиологии.– 1994.– №2.– С. 11-16.
18. *Рамазанов В.В., Семенченко А.Ю., Воловельская Е.Л. и др.* Влияние прочности связи периферических белков с мембранами на гипертонический шок эритроцитов // Пробл. криобиологии.– 1996.– №3.– С. 8-11.
19. *Рамазанов В.В., Семенченко А.Ю., Воловельская Е.Л. и др.* Действие протеолитической обработки на холодовой

Our data also demonstrate that the decrease of cell sensitivity to further stress effect (cooling, hypertonic either hypotonic shock) may be connected not only with cations outflux, but also with finishing of lateral re-distribution of membrane components up to 20-30 min of exposure, especially at a moderate hypertonicity. The cells are thought to be the most sensitive during this process to further changes of the medium conditions.

References

1. *Belous A.M.* Role of cytoskeleton proteins in cold resistance of cells // Kriobiologia.– 1990.– N3.– P. 3-11.
2. *Bondarenko V.A., Bondarenko T.P., Rudenko S.V.* Dehydration effects in controlling cold and osmotic cells sensitivity // Problems of Cryobiology.– 1992.– N4.– P. 14-25.
3. *Bondarenko T.P.* Combined effect of temperature and medium osmolarity on erythrocytes resistance to hypertonic stress // Problems of Cryobiology.– 1993.– N2.– P. 11-16.
4. *Gordienko E.A., Voynova M.V.* Physical and mathematical model of lipid lateral re-distribution at isothermal deformation // Kriobiologia.– 1985.– N3.– P. 43-48.
5. *Gordienko E.A., Pushkar N.S.* Physical backgrounds for low temperature cell suspension preservation.– Kiev: Naukova dumka, 1994.– 143 p.
6. *Gordienko E.O., Gordienko O.I., Kovalenko I.F. et al.* Physical and mathematical analysis and experimental determination of erythrocytes distribution density of human donor's and cord blood by the sphericity index // Bulletin of Kharkiv University. N488. Biophysical Bulletin.– 2000.– Issue 6.– P. 75-78.
7. *Gordienko O.I.* Barrier-transport function of erythrocyte membranes under combined effect of low temperatures and ultrasound oscillations. Thesis of the candidate of science (biology).– Kharkov.– 1983.– 138 p.
8. *Gordienko O.I., Emets B.G., Zhilyakova T.A., Sheykin V.I.* Temperature dependence of water-diffusion permeability of erythrocytes membranes in various ionic force media // Biol. Membrany.– 1985.– Vol. 2, N3.– P. 310-314.
9. *Dunayevskaya O.N., Panatler E.R., Shpakova N.M., Bondarenko V.A.* Some possibilities of erythrocytes resistance increase upon cold and osmotic effects when using cationic amphipates // Problems of Cryobiology.– 1995.– N1.– P. 21-27.
10. *Kovalenko S.E.* Cause and mechanism of the phenomenon of hypertonic cryohemolysis: Thesis of the candidate of science (biology).– Kharkov, 1999.– 123 p.
11. *Olejnik O.A., Ramazanov V.V., Bondarenko V.A.* Posthypertonic lysis of modified erythrocytes in citrate medium // Problems of Cryobiology.– 2003.– N3.– P. 21-29.
12. *Orlova N.V.* Effect of amphiphilic compounds on osmotic and temperature erythrocytes sensitivity: Thesis of candidate of sciences (biology).– Kharkov, 2001.– 142 p.
13. *Pozdnyakov V.V.* Effect of the medium composition and osmolarity on erythrocytes resistance to temperature and osmotic shock: Thesis of candidate of sciences (biology).– Kharkov, 1988.– 121 p.
14. *Pozdnyakov V.V., Bondarenko V.A.* Interrelation between the initial medium conditions and erythrocytes sensitivity upon hypertonic stress in 4M NaCl solution // Kriobiologia.– 1989.– N1.– P. 47-49.
15. *Ramazanov V.V., Bondarenko V.A.* Comparative study of cold and hypertonic erythrocytes shock in NaCl solution // Problems of Cryobiology.– 1996.– N1.– P. 34-37.

- шок эритроцитов // Пробл. криобиологии.– 1998.– №2.– С. 46-49.
20. *Сынчикова О.П.* Влияние амфифильных соединений на гипертонический гемолиз эритроцитов: Дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 2003.– 142 с.
 21. *Черницкий Е.А., Воробей А.В.* Структура и функции эритроцитарных мембран.– Минск: Наука и техника, 1981.– 216 с.
 22. *Шпакова Н.М., Бондаренко В.А.* Чувствительность эритроцитов к холодовому шоку в средах, содержащих соли и неэлектролиты // Пробл. криобиологии.– 1992.– №3.–С. 15-20.
 23. *Пат. 47910А (Україна) МПК⁷ G01N33/49.* Спосіб визначення щільності ймовірності розподілу еритроцитів за індексом сферичності / Є.О. Гордієнко, О.І. Гордієнко, Ю.Є. Гордієнко, І.Ф. Коваленко, Л.І. Алексеєва.– Опубл. 15.07.02. Бюл. №7.– С. 4.106.
 24. *Conlon T., Outhred R.* The temperature dependence of erythrocyte water diffusion permeability // BBA.– 1978.– Vol. 511.– P. 408-418.
 25. *Daw A., Farrant J., Morris G.J.* Membrane leakage of solutes after thermal shock or freezing // Cryobiology.– 1973.– Vol. 10, N2.– P. 126-133.
 26. *Farrant J., Morris G.J.* Thermal shock and dilution shock as the causes of freezing injury // Cryobiology.– 1973.– Vol. 10.– P. 134-140.
 27. *Farrant J., Woolgar A.E.* Human red cells under hypertonic conditions; a model system for investigating freezing damage. 1. Sodium chloride // Cryobiology.– 1972.– Vol. 9, N2.– P. 9-15.
 28. *Farrant J., Woolgar A.E.* Human red cells under hypertonic conditions; a model system for investigating freezing damage. 2. Sucrose // Cryobiology.– 1972.– Vol. 9, N2.– P. 16-21.
 29. *Haest C.W.M.* Interactions between membrane skeleton proteins and the intrinsic domain of the erythrocyte membrane // BBA.–1982.– Vol. 694.– P. 331-352.
 30. *Hsu L., Morrison M.* The interaction of human erythrocyte band 3 with cytoskeletal components // Arc. Biochem. Biophys.– 1983.– Vol. 227, N1.–P. 31-38.
 31. *Humphries G.M.K., Lovejoy I.P.* Lateral phase separation of phospholipids as a basis for increased permeability of membranes towards fluorescent and other chemical species // J. Membr. Biol.– 1984.– Vol. 80.– P. 249-257.
 32. *Morris G.J., Farrant J.* Effects of cooling rate on thermal shock hemolysis // Cryobiology.– 1973.– Vol. 10, N2.– P. 119-125.
 16. *Ramazanov V.V., Bondarenko V.A.* Hemine and DIDS effect on cold and hypertonic shock of erythrocytes // Problems of Cryobiology.– 1996.– N2.– P. 13-17.
 17. *Ramazanov V.V., Rudenko S.V., Bondarenko V.A.* Effect of cytoskeleton modifiers on hypertonic shock sensitivity of erythrocytes when increasing pre-incubation medium osmolarity // Problems of Cryobiology.– 1994.– N2.– P. 11-16.
 18. *Ramazanov V.V., Semenchenko A.Yu., Volovelskaya E.L. et al.* Effect of tightness of peripheric proteins bond with membranes on erythrocytes hypertonic shock // Problems of Cryobiology.– 1996.– N3.– P. 8-11.
 19. *Ramazanov V.V., Semenchenko A.Yu., Volovelskaya E.L. et al.* Proteolytic treatment effect on cold shock of erythrocytes // Problems of Cryobiology.– 1998.– N2.– P. 46-49.
 20. *Synchikova O.P.* Effect of amphiphilic compounds on erythrocytes hypertonic hemolysis: Thesis of candidate of sciences (biology).– Kharkov, 2003.– 141 p.
 21. *Chernitsky E.A., Vorobej A.V.* Structure and function of erythrocyte membranes.– Минск: Nauka i tekhnika, 1981.– 216 p.
 22. *Shpakova N.M., Bondarenko V.A.* Erythrocytes cold shock sensitivity in salts- and non-electrolytes-containing media // Problems of Cryobiology.– 1992.– N3.– P. 15-20.
 23. *Patent of Ukraine N47910, IPC G01N33/49.* Method for density determination of erythrocytes distribution probability by sphericity index / E.O. Gordienko, O.I. Gordienko, Yu.E. Gordienko, I.F. Kovalenko, L.I. Alekseeva. Accepted in 26.10.2001; Issued on 15.07.02, Bul. N7-P. 4.106.
 24. *Conlon T., Outhred R.* The temperature dependence of erythrocyte water diffusion permeability // BBA.– 1978.– Vol. 511.– P. 408-418.
 25. *Daw A., Farrant J., Morris G.J.* Membrane leakage of solutes after thermal shock or freezing // Cryobiology.– 1973.– Vol. 10, N2.– P. 126-133.
 26. *Farrant J., Morris G.J.* Thermal shock and dilution shock as the causes of freezing injury // Cryobiology.– 1973.– Vol. 10.– P. 134-140.
 27. *Farrant J., Woolgar A.E.* Human red cells under hypertonic conditions; a model system for investigating freezing damage. 1. Sodium chloride // Cryobiology.– 1972.– Vol. 9, N2.– P. 9-15.
 28. *Farrant J., Woolgar A.E.* Human red cells under hypertonic conditions; a model system for investigating freezing damage. 2. Sucrose // Cryobiology.– 1972.– Vol. 9, N2.– P. 16-21.
 29. *Haest C.W.M.* Interactions between membrane skeleton proteins and the intrinsic domain of the erythrocyte membrane // BBA.–1982.– Vol. 694.– P. 331-352.
 30. *Hsu L., Morrison M.* The interaction of human erythrocyte band 3 with cytoskeletal components // Arc. Biochem. Biophys.– 1983.– Vol. 227, N1.–P. 31-38.
 31. *Humphries G.M.K., Lovejoy I.P.* Lateral phase separation of phospholipids as a basis for increased permeability of membranes towards fluorescent and other chemical species // J. Membr. Biol.– 1984.– Vol. 80.– P. 249-257.
 32. *Morris G.J., Farrant J.* Effects of cooling rate on thermal shock hemolysis // Cryobiology.– 1973.– Vol. 10, N2.– P. 119-125.

Надійшла 25.08.2004

Accepted in 25.08.2004