

Влияние различных анионов на постгипертонический лизис эритроцитов

О.А. ОЛЕЙНИК, Ф. АБУ АЛЬ АСАЛЬ, В.В. РАМАЗАНОВ, В.А. БОНДАРЕНКО
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Various Anions on Posthypertonic Lysis of Erythrocytes

OLEJNIK O.A., ABU AL ASAL F., RAMAZANOV V.V., BONDARENKO V.A.
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Исследовали влияние вариаций анионного состава сред регидратации на чувствительность клеток к постгипертоническому лизису (ПГЛ). Показано, что уровень постгипертонического повреждения эритроцитов определяется поступлением в клетку в момент регидратации проникающих анионов. Отмечено, что цитоскелет принимает участие в регуляции устойчивости эритроцитов к ПГЛ.

Ключевые слова: постгипертонический лизис, анионы, дипиридамо́л, ДИДС.

Досліджували вплив варіацій аніонного складу середовищ регідратації на чутливість клітин до постгіпертонічного лізису (ПГЛ). Показано, що рівень постгіпертонічного пошкодження еритроцитів обумовлюється надходженням до клітини в момент регідратації проникаючих аніонів. Показано, що цитоскелет також приймає участь у регуляції стійкості еритроцитів до ПГЛ.

Ключові слова: постгіпертонічний лізис, аніони, діпіридамо́л, ДІДС

We have studied the effect of variations with different anionic content of the rehydration media on cell sensitivity to posthypertonic lysis (PHL). We have shown that the level of erythrocytes' posthypertonic damage is determined by entering in a cell of penetrating anions at the moment of rehydration. It was noted that cytoskeleton participated in the regulation of erythrocytes resistance to PHL.

Key words: posthypertonic lysis, anions, dipiridamol, DIDS.

Низкотемпературное консервирование органов и тканей – одно из важных направлений современной биологии. Среди используемых консервируемых тканей особое место занимают эритроциты, механизмы повреждения и устойчивости которых при инкубации в низкотемпературных условиях и последующем размораживании необходимо изучить. Особый интерес представляет механизм ПГЛ эритроцитов – явление гемолиза, индуцированное инкубацией их в дегидратирующей, а затем в регидратирующей средах. Данный тип лизиса может служить моделью повреждения клеток при медленном замораживании-оттаивании [10, 11, 17].

Известно, что гемолитическая пора формируется в начальный момент регидратации эритроцитов при переносе их из гипертонических [7, 24] сред в изотонические, когда резкое увеличение притока воды в клетку вызывает ее объемные сдвиги, которые могут индуцировать нарушение целостности цитоплазматической мембраны. На формирование поры влияют некоторые вещества, например, дивалентные катионы цинка и кальция, сахароза, рН и т. д. [2, 19, 20]. Степень развития ПГЛ клеток также сильно зависит от температуры и времени инкубации их

Haemolytic pore is known to be formed at the starting moment of erythrocytes dehydration when transferring them out of hypertonic media [7, 24] into isotonic ones, when a sharp increase of water influx into a cell causes its volumetric shifts, which may induce the damage of cytoplasmatic membrane integrity. Certain substances affect the pore formation, such as bivalent zinc and calcium cations, sucrose, pH etc. [2, 19, 20]. An extent of PHL development in cells also significantly depends on the temperature and time of their incubation in dehydrating and rehydrating media [3, 4, 9, 24], osmolarity and ionic force [19, 23].

Studying of the effect of various rehydration media, for instance, of the series of sodium salts, as well as anionic transport inhibitors on erythrocytes susceptibility to PHL was the aim of the work.

Materials and methods

We have used donors' blood erythrocytes of the 2nd group. PHL of red cells was performed by transferring cell suspension aliquots out of 3mol/l NaCl (10min exposure), as well as out of 1.5mol/l NaCl (45min exposure) into isotonic rehydrating media. Isotonic media comprised the following sodium salts (mmol/l): NaCl – 150; sodium pyruvate – 150; sodium salicylate – 150; sodium isothiocyanate – 150, sodium

Адрес для корреспонденции: Олейник О.А. Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 7720135, факс: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Olejnik O.A. Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7720135, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

в дегидратирующей и регидратирующей средах [3,4,9,24], осмолярности и ионной силы этих сред [19, 23].

Цель работы – исследование влияния различных сред регидратации, в частности ряда натриевых солей, а также ингибиторов анионного транспорта, на чувствительность эритроцитов к ПГЛ.

Материалы и методы

В работе использовали эритроциты донорской крови группы II. ПГЛ эритроцитов осуществляли перенесением аликвот клеточной суспензии из 3 моль/л NaCl (экспозиция 10 с) и из 1,5 моль/л NaCl (экспозиция 45 мин) в изотонические регидратирующие среды. Изотонические среды включали следующие натриевые соли (ммоль/л): NaCl - 150, пируват натрия - 150, салицилат натрия - 150, изотиоцианат натрия - 150, ацетат натрия - 150, бромид натрия - 150, сульфат натрия - 110, трёхзамещённый цитрат натрия - 106 (рН 7,4). Вышеуказанные анионы замещали на хлорид-анионы. В экспериментах использовали ингибиторы анионного транспорта диизотиоцианостильбендисульфонат (ДИДС) и дипиридамо́л. Уровень гемолиза эритроцитов определяли путём регистрации изменения оптической плотности суспензии эритроцитов при длине волны 720 нм. Концентрация клеток в кювете соответствовала 0,3 ед. оптической плотности. Уменьшение интенсивности света, прошедшего через кювету с образцом, обусловлено рассеянием суспензии на малые углы, определяющееся количеством гемоглобин-содержащих клеток, сохраняющих заметную разность показателей преломления среды внутри и снаружи эритроцита (Δn). Выброс гемоглобина из одиночной клетки обычно завершается за 5-10 с и в масштабах минутного эксперимента Δn для одиночной клетки изменяется скачком.

Результаты и обсуждение

Как видно из рис. 1,а, степень постгипертонического повреждения клеток после предварительной инкубации в гипертоническом растворе NaCl с концентрацией 1,5 ммоль/л зависит от состава изотонических сред. Так, при замещении анионов хлора на ионы изотиоцианата (кривая 1) и бромида (кривая 2) в регидратирующей среде уровень постгипертонического повреждения клеток не изменяется. При замещении хлоридных анионов на анионы пирувата (кривая 3), ацетата (кривая 4), салицилата (кривая 5) наблюдается снижение уровня гемолиза клеток (от 60 до 50 %). Аналогичные результаты были получены и для эритроцитов, регидратированных после гипертонической инкубации в 3 моль/л NaCl (рис.1,б).

acetate – 150, trisubstituted sodium citrate (pH 7.4). The mentioned above anions were substituted for chloride-anions. In the experiments we have used anionic transport inhibitors such as DIDS and dipiridamol. The level of erythrocytes haemolysis was noted by recording the change of an optic density in erythrocytes suspension at wave length of 720 nm. Cell concentration in the cuvette corresponded to 0.3 optic density units. Elimination of light intensity which passed through the cuvette with the sample was stipulated by the suspension scattering on small angles, that was determined by the extent of haemoglobin-containing cells, which kept a significant difference in the indices of the medium refraction inside and outside of erythrocytes (Δn). Haemoglobin release out of a single cell usually finishes by 5-10 s and within the scale of a minute experiment Δn for a single cell changes jump-wise.

Results and discussion

The Fig. 1a shows that degree of posthypertonic cell damage following preincubation under NaCl hypertonic solution with the concentration of 1.5mol/l depends upon isotonic media composition. When substituting chlorine anions for isotiocyanate ions (curve 1) and bromide (curve 2) the level of posthypertonic cell damage is not changing. When substituting chloride anions for pyruvate anions (curve 3), for acetate (curve 4), salicylate (curve 5), we observe the decrease in cell haemolysis level (60 to 50%). Similar results were also obtained for the erythrocytes, rehydrated after hypertonic incubation under 3mol/l NaCl (Fig. 1b).

Substitution of chlorine anions for sulphate anions (Fig. 2a) results in the PHL elimination in cells both after the incubation under 3mol/l NaCl (Fig. 2a), and after the exposure under 1.5 mol/l NaCl (Fig. 2b).

The most manifested decrease of the degree of erythrocytes' posthypertonic damage (15-20%) was noted when substituting chlorine anions for citrate anions in rehydrating medium following their incubation in NaCl hypertonic solutions with 1.5mol/l concentration (Fig. 2c) and the concentration of 3mol/l (Fig. 2d).

Fig. 3 presents the change of the level of optic density for erythrocytes suspension depending upon DIDS concentration in citrate medium following erythrocytes incubation under NaCl hypertonic solution with the concentration of 1.5 mol/l. It is shown that this inhibitor under the concentration of 5 μ mol/l has already eliminated the level of optic density. Further increase of the inhibitor concentration induces more significant decrease of the level of optic density. Such effects are also observed for the cells incubated preliminarily under 3mol/l NaCl (Fig.3, b).

Dipiridamol effect on erythrocytes susceptibility to PHL differs upon the one for DIDS. Its use

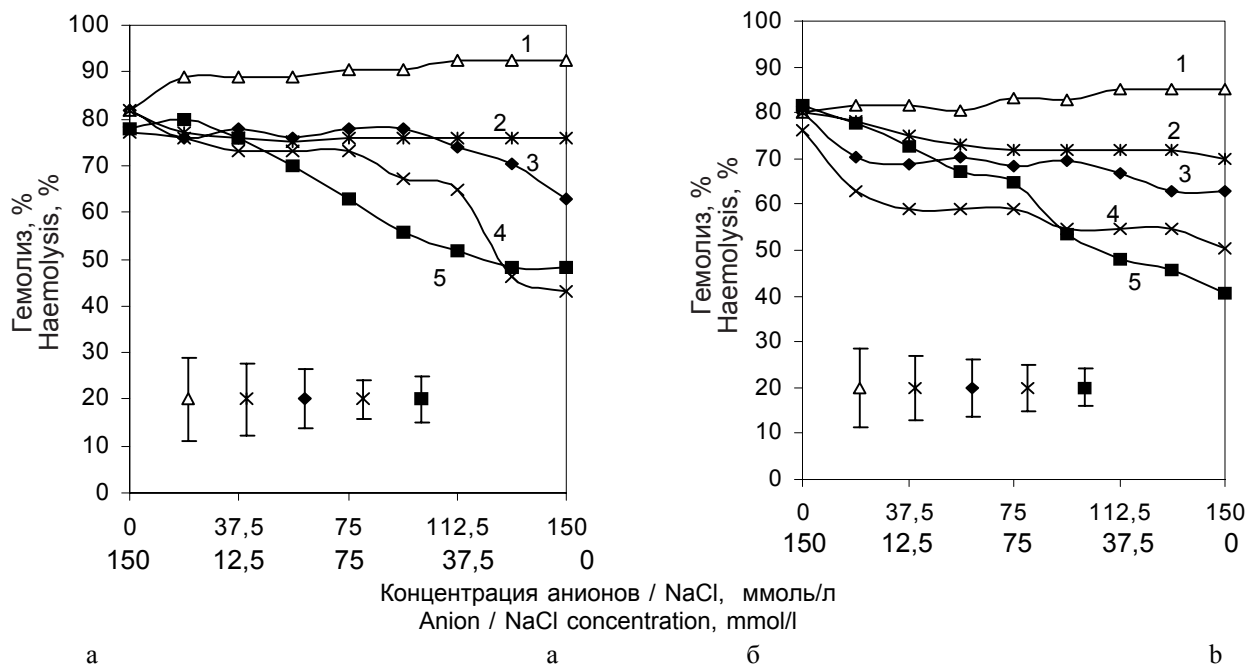


Рис. 1. Влияние замещения хлорида на другие анионы в регидратирующих средах на ПГЛ эритроцитов после инкубации в NaCl: а – 1,5 моль/л, б – 3 моль/л: 1 – изотиоцианат натрия, 2 – бромид натрия, 3 – пируват натрия, 4 – ацетат натрия, 5 – салицилат натрия.

Fig. 1. Effect of chloride substitution for other anions in rehydrating media on PHL of erythrocytes after incubation in NaCl: a – 1.5M, b – 3mol/l: 1 – sodium isocyanate; sodium bromide; 3 – sodium pyruvate; 4 – sodium acetate; sodium salicylate.

Замещение анионов хлора на анионы сульфата (рис.2, а) приводит к уменьшению ПГЛ клеток как после инкубации в 3 моль/л NaCl (рис.2, а), так и после экспозиции в 1,5 моль/л NaCl (рис.2, б).

Наиболее выраженное снижение степени постгипертонического повреждения эритроцитов (15-20 %) наблюдалось при замещении анионов хлора на анионы цитрата в регидратирующей среде после их инкубации в гипертонических растворах NaCl с концентрацией 1,5 моль/л (рис.2, в) и 3 моль/л (рис.2, г).

На рис. 3, а представлено изменение уровня оптической плотности суспензии эритроцитов в зависимости от концентрации ДИДС в цитратной среде после инкубации эритроцитов в гипертоническом растворе NaCl в концентрации 1,5 моль/л. Видно, что данный ингибитор уже в концентрации 5 мкмоль/л снижает уровень оптической плотности. Дальнейшее увеличение концентрации ингибитора вызывает ещё большее снижение уровня оптической плотности. Подобные эффекты наблюдаются и для клеток, предварительно проинкубированных в 3 моль/л NaCl (рис.3, б).

Действие дипиридамола на чувствительность эритроцитов к ПГЛ отличается от действия ДИДС. Его использование не влияет на чувствительность клеток к ПГЛ после их экспозиции в растворах NaCl с концентрацией как 1,5 моль/л, так и 3 моль/л (рис. 4). При этом данный ингибитор не изменяет чувствительность эритроцитов к ПГЛ даже в концентрации

influences the cell susceptibility to PHL after their exposure in NaCl solutions with the concentrations both of 1.5 mol/l and 3mol/l (Fig. 4) In this case the inhibitor does not change erythrocytes resistance to PHL even under the concentration of 100µmol/l.

As the data show, the level of erythrocytes' PHL depends upon the type of anions entering the rehydration medium. Certain regularities are noticed in cell response to the presence of various anions in rehydrating medium. During PHL the erythrocytes' membrane is getting the defects, sizes of those depend upon the incubation and rehydration media osmolarity [3]. It can be supposed that the defect will be penetrating for different sizes' anions. The dependence of PHL level upon the molecular mass of the anions present in rehydrating medium is noted: with the molecular mass increase certain protecting effect of anions. There are the data [8] testifying to the dependence of membrane pore permeability upon the anions size. Referring to this fact we can suppose that elimination of posthypertonic damage of erythrocytes in the media containing large-sized anions (acetate, pyruvate, salicylate, sulfate, citrate) comparing to small-sized ones (chlorine, bromide, isotiocyanate) is related to their insignificant influx into a cell because of the defects, though there are some notions different to the present one. For example, molecular mass of chlorine makes 35.5, and SCN is 58, although in the presence of sodium isotiocyanate the higher level of erythrocytes haemolysis comparing to NaCl is observed. This

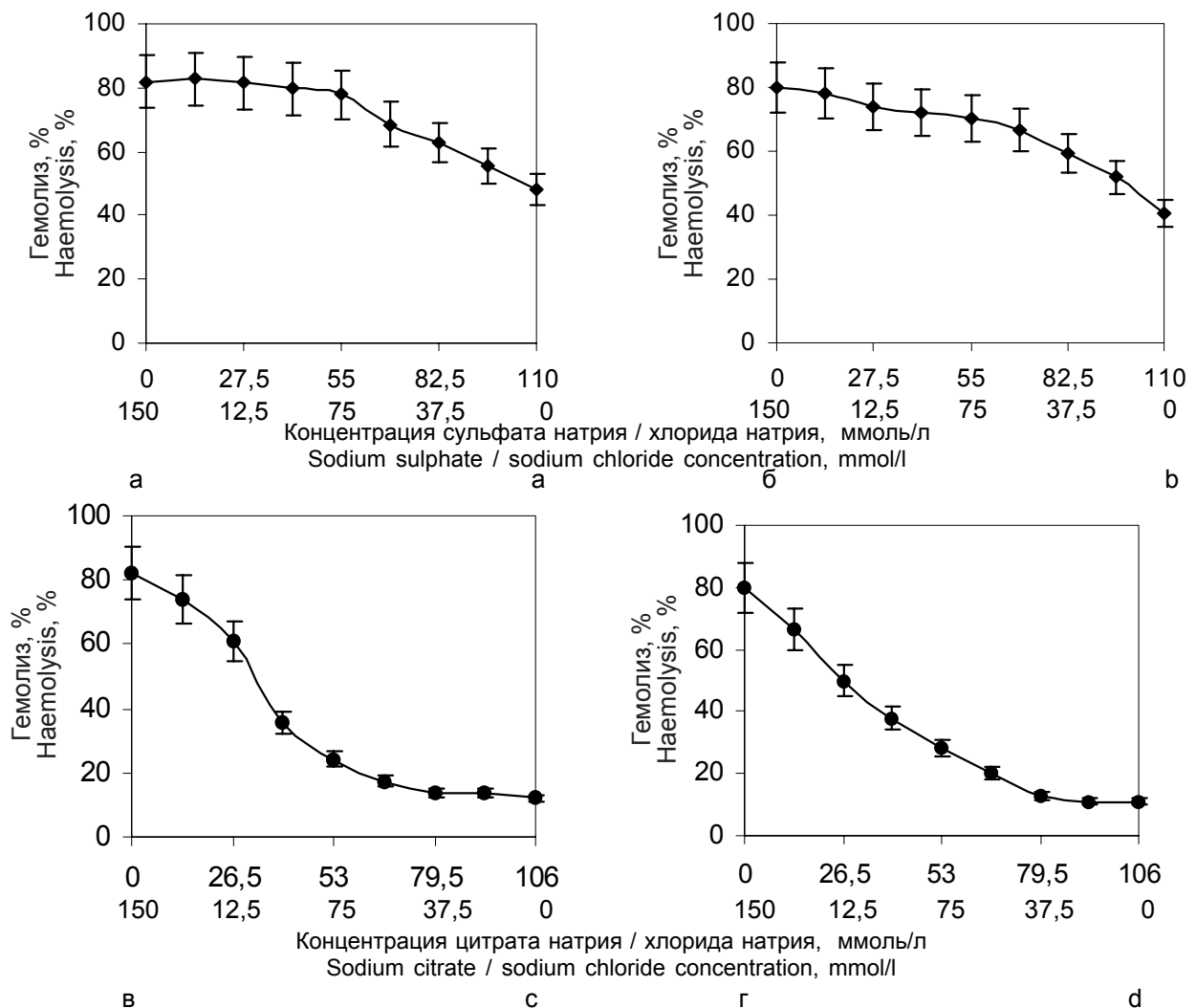


Рис. 2. Влияние замещения хлорида на сульфат натрия (а,б) и цитрат натрия (в, г) в регидратирующих средах на ПГЛ эритроцитов после инкубации в NaCl: а, в – 1,5 моль/л; б, г – 3 моль/л.
Fig. 2. Effect of chloride substitution for sodium sulfate (a, b) and sodium citrate (c, d) in rehydrating media on PHL of erythrocytes after incubation in NaCl: a,c – 1.5; b,d – 3 mol/l.

100 мкмоль/л.

Как видно из представленных данных, уровень ПГЛ эритроцитов зависит от типа анионов, входящих в среду регидратации. Прослеживаются некоторые закономерности в ответе клеток на присутствие различных анионов в регидратирующей среде. Так, во время ПГЛ мембрана эритроцитов получает дефекты, размеры которых зависят от осмолярности сред гипертонической инкубации и регидратации [3]. Можно предположить, что дефект будет в разной степени проницаем для анионов различных размеров. Отмечается зависимость уровня ПГЛ от молекулярной массы анионов, присутствующих в регидратирующей среде: с увеличением молекулярной массы анионов наблюдается их некоторое протектирующее действие. В работе [8] представлены данные, свидетельствующие о зависимости проницаемости мембранной поры от размеров анионов. Исходя из этого можно предположить, что

discrepancy must have been explained by the fact that isothiocyanate ion chaotropically affects both erythrocytes membrane and isolated enzymes by increasing their activity [18]. Isothiocyanate ion affects vesicles in the same way as well [6]. Taking into consideration the molecular mass of pyruvate anion, which makes 88 and that is more than of the mentioned anions, we can suppose that its slight protecting effect is connected with its penetration into a cell. Protecting effect of sulfate anion and citrate might be related to the fact that during rehydration they get into a cell insignificantly. For example, sulfate with a slow rate penetrates inside the erythrocytes[5], but citrate does not penetrate it at all, as it has low affinity to a chloride transport site [21].

DIDS is an irreversible inhibitor of anion channel [15], but dipiridamol is reversible one [16], however either possess the ability to block chloride anions redistribution. Their application allowed to elucidate the role of chloride anions' redistribution in cell

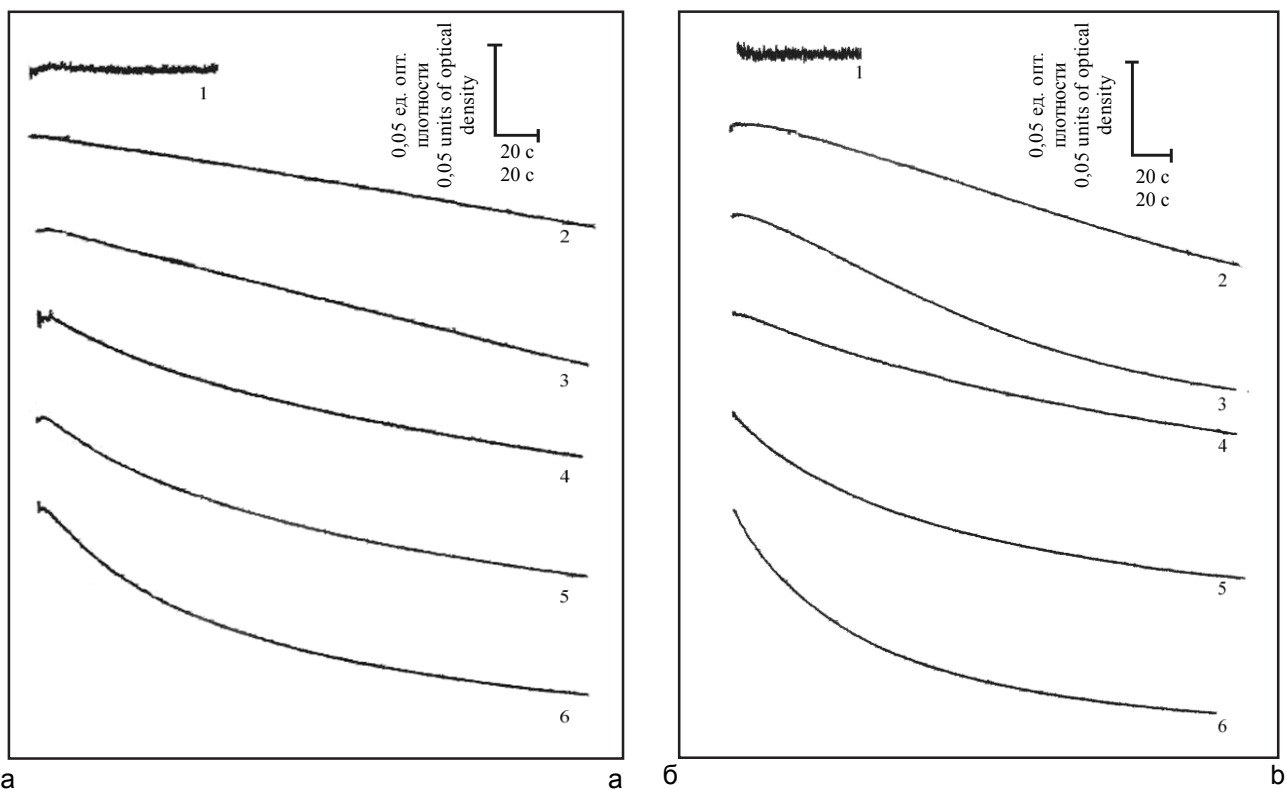


Рис. 3. Влияние ДИДС на ПГЛ эритроцитов в среде, содержащей 106 мМ трёхзамещённого цитрата Na, pH 7,4 после инкубации в растворах NaCl (а – 1,5 моль/л, б – 3 моль/л): 1 – контроль; 2 – 5 мкмоль/л; 3 – 10 мкмоль/л; 4 – 20 мкмоль/л; 5 – 50 мкмоль/л; 6 – 100 мкмоль/л.

Fig. 3. DIDS effect on PHL of erythrocytes in the medium, containing 106mM of trisubstituted sodium citrate, pH 7.4, after the incubation in NaCl solutions. a – 1.5, b – 3mol/l: 1 – control, 2 – 5 μmol/l; 3 – 10 μmol/l; 4 – 20 μmol/l; 5 – 50 μmol/l; 6 – 100 μmol/l.

уменьшение постгипертонического повреждения эритроцитов в средах, содержащих анионы большого размера (ацетат, пируват, салицилат, сульфат, цитрат) и по сравнению с анионами малого размера (хлор, бром, изотиоцианат), связано с их незначительным поступлением в клетку через дефекты, хотя и имеются некоторые несоответствия данному предположению. Например, молекулярная масса Cl составляет 35,5, а SCN – 58, хотя в присутствии изотиоцианата натрия наблюдается более высокий уровень гемолиза эритроцитов по сравнению с NaCl. Данное несоответствие, вероятно, объясняется тем, что изотиоцианатный ион хаотропно действует как на мембрану эритроцитов, так и на изолированные ферменты, увеличивая их активность [18]. Изотиоцианатный анион подобным образом действует и на везикулы [6]. Исходя из молекулярной массы аниона пирувата, которая составляет 88 и которая больше вышеназванных анионов, можно предположить, что его незначительный защитный эффект связан с проникновением в клетку. Протектирующее действие аниона сульфата и цитрата с молекулярной массой 96 и 210 соответственно, очевидно, связано с тем, что во время регидратации они незначительно поступают в клетку.

rehydration control. The use of various classes of anion transport inhibitors demonstrated that redistribution of chloride anions through anionic transporter does not affect the erythrocytes posthypertonic sensitivity. The DIDS strengthening effect on cell sensitivity to PHL might have been explained by the inhibitor's effect on the change of band-3 protein binding with cytoskeleton, as there are the data testifying to the transmembrane effect of DIDS on cytoskeleton components' binding [14]. In this case DIDS influencing the interaction of band-3 protein and cytoskeleton causes the changes promoting the reduction of a protective effect in a citrate rehydrating medium. These data allowed to suppose a significant role of cytoskeleton when checking erythrocytes sensitivity to PHL.

Erythrocytes hypertonic lysis is known to be related to the class of phenomena classified as a relaxational lysis. For erythrocytes relaxational mechanism of PHL may be rather obvious considering the possibility of relative response of membrane cytoskeleton and lipid bilayer to the change of cell volume under the conditions of osmotic shift. Protein cytoskeleton is a mobile net, the character of elements' association of which depends upon a few factors [12], in particular, upon the density and contacts between the components of cytoskeleton and membrane, ionic power of

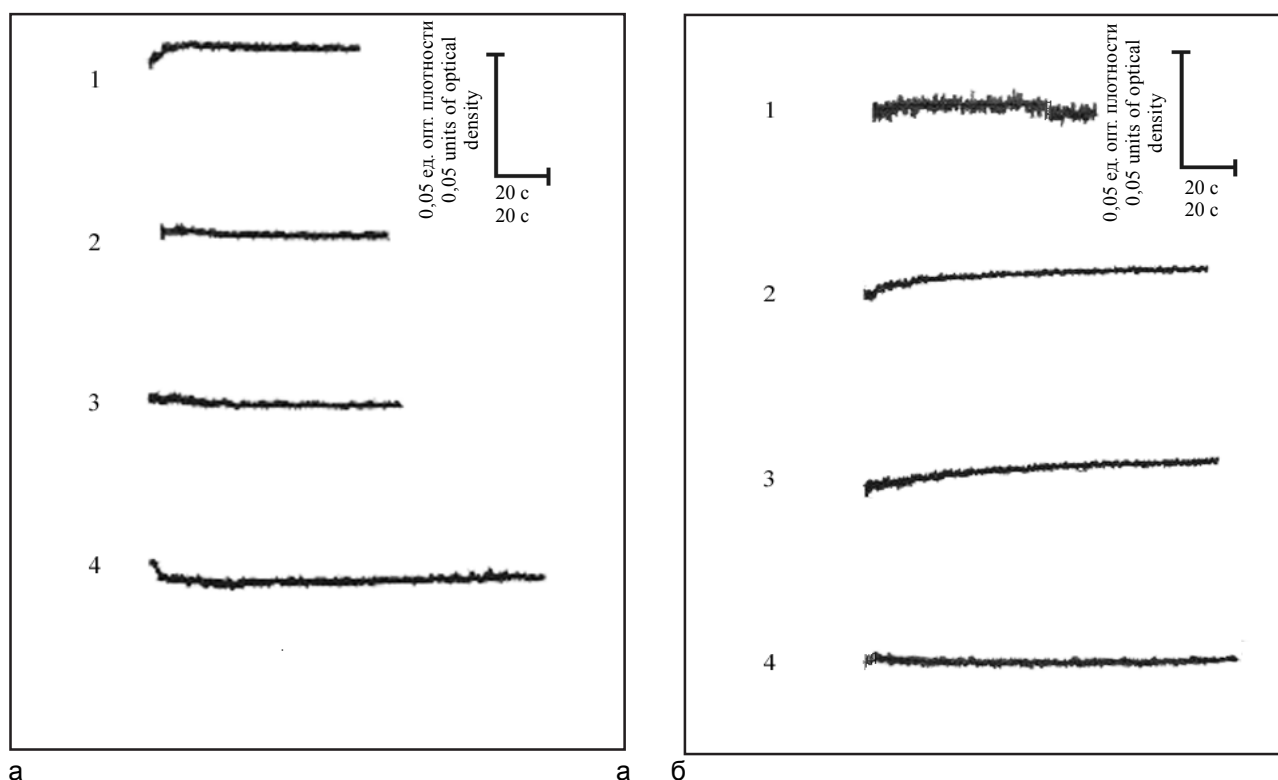


Рис. 4. Влияние дипиридамола на постгипертонический лизис эритроцитов в среде, содержащей 106 мМ трёхзамещённого цитрата Na, pH 7,4 после инкубации в растворах NaCl (а – 1,5 моль/л, б – 3 моль/л): 1 – контроль; 2 – 20 мкмоль/л; 3 – 50 мкмоль/л; 4 – 100 мкмоль/л.

Fig. 4. Dipyridamol effect on PHL of erythrocytes in the medium, containing 106 mM of trisubstituted sodium citrate, pH 7.4 after incubation in NaCl solutions: a – 1.5 mol/l, b – 3 mol/l; 1 – control; 2 – 20 μmol/l; 3 – 50 μmol/l, 4 – 100 μmol/l.

Например, сульфат с медленной скоростью проникает в эритроциты [5], а цитрат вообще не проникает в клетку, так как он обладает низким сродством к хлоридному транспортному сайту [21].

ДИДС является необратимым ингибитором анионного канала [15], а дипиридамола обратимым [16], но и тот и другой обладают способностью блокировать перераспределение анионов хлорида. Их применение позволило уяснить роль перераспределения анионов хлорида в контроле регидратации клеток. Использование разного класса ингибиторов анионного транспорта показало, что перераспределение анионов хлорида через анионный переносчик не влияет на чувствительность эритроцитов к ПГЛ, поскольку дипиридамола в цитратной регидратирующей среде не влияет на постгипертоническую чувствительность эритроцитов. Усиливающее действие ДИДС на чувствительность клеток к ПГЛ объясняется, по-видимому, действием ингибитора на изменение связывания белка полосы 3 с цитоскелетом, поскольку имеются данные, свидетельствующие о трансмембранном действии ДИДС на связывание цитоскелетных компонентов [14]. В нашем случае ДИДС, влияя на взаимодействие белка полосы 3 с цитоскелетом, вызывает в нём такие

intracellular medium, pH and the temperature. The size of cytoskeleton net affects the density of negative charges and stipulates the importance of such factors as ionic force and pH inside a cell [22]. The more manifested cytoskeleton condensation, the higher ionic force of intracellular medium is, and pH shift to acidification is stronger. It would be natural to suppose that all the factors mentioned depended both upon the osmolarity of extracellular medium and its composition, in particular, upon the anion content.

Corresponding effects of anions in the modulation of structural state of cytoskeleton may depend upon some factors, but obviously the major of them is membrane permeability for this anion as well as the effect of anion content on pH inside a cell. We may suppose that the level of PHL in erythrocytes when changing the anion medium content will depend upon the fact in which volumetric changes of cytoskeleton and membrane will be finally coordinated at the transition stage to lower osmolarity. Obviously, the process of volumetric recovery of membrane-cytoskeleton complex will be less coordinated under the conditions when the minimum volume is achieved during hypertonic dehydration [1]. By other words, such a factor as an amplitude of volumetric changes may be the key point under such conditions. The higher amplitude is, the less cell stability to PHL is. It means

изменения, которые способствуют редукции защитного эффекта цитратной регидратирующей среды. Эти данные позволили предположить о существенной роли цитоскелета в контроле чувствительности эритроцитов к ПГЛ.

Известно, что ПГЛ эритроцитов относится к классу явлений, классифицируемых как релаксационный лизис. Для эритроцитов релаксационный механизм ПГЛ может быть весьма вероятным с учётом возможности относительного реагирования мембранного цитоскелета и липидного бислоя на изменение объёма клетки в условиях осмотического сдвига. Белковый цитоскелет представляет собой подвижную сеть, характер ассоциации элементов которой зависит от нескольких факторов [12], в частности от плотности контактов между компонентами цитоскелета и мембраны, ионной силы внутриклеточной среды, pH и температуры. Объём цитоскелетной сети влияет на плотность отрицательных зарядов, что и обуславливает значение таких факторов, как ионная сила и pH внутри клетки [22]. Конденсация цитоскелета тем более выражена, чем больше ионная сила внутриклеточной среды и сильнее сдвиг pH в сторону закисления. Естественно предположить, что оба указанных фактора зависят как от осмолярности внеклеточной среды, так и от её состава, в частности от состава анионов. Соответствующие эффекты анионов в модуляции структурного состояния цитоскелета могут зависеть от нескольких факторов, но главными, по-видимому, являются проницаемость мембраны для данного аниона и влияние анионного состава на pH внутри клетки. Можно предположить, что уровень ПГЛ эритроцитов при изменении анионного состава среды будет зависеть от того, насколько согласованными в конечном итоге будут объёмные изменения цитоскелета мембраны на этапе перехода к более низкой осмолярности. Очевидно, менее согласованным будет процесс объёмного восстановления мембрано-цитоскелетного комплекса в условиях, когда достигается минимальный объём при гипертонической дегидратации [1]. Иными словами, ключевым в этих условиях может являться такой фактор, как амплитуда объёмных изменений. Чем больше амплитуда, тем меньше устойчивость клетки к ПГЛ. Это означает, что эффект анионов в условиях развития ПГЛ сводится к контролю объёма клетки в условиях осмотической дегидратации [13]. Соответственно можно ожидать, что включение проникающих анионов в среду регидратации будет проявляться в увеличении уровня ПГЛ, что обусловлено их низкой способностью предотвращать или тормозить фазу увеличения клеточного объёма на этапе регидратации. Это означает, что

that anions effect under the conditions of PHL development is minimized to controlling the cell volume under the conditions of osmotic dehydration [13].

Correspondingly, we may suppose that inclusion of penetrating anions into rehydration medium will be manifested in an increase of PHL level, that is stipulated by their low capability of preventing or suppressing the phase of cell volume increase at the stage of rehydration. It means that in the media with penetrating anions the membrane defect structure will be the cause of cell swelling to the volume exceeding the norm. If under the conditions of hypertonic incubation a cell catches some of hypertonic solution, the swelling will be the final effect. Under the conditions mentioned, slightly penetrating and non-penetrating anion may play a protecting role, preventing the process of cell swelling. Relaxational mechanism of PHL may lay in the delaying of cytoskeleton volumetric recovery at the background of a rapid increase of membrane volume, that may be the cause of non stability or dissociation of skeleton components from the membrane in some its separate sites. Probably, for PHL, the same as for hyperosmotic and cold shock we may notice such a factor as the presence of a "transitional" stage or the stage of instability with a rapid change of medium osmolarity where the cell is present. High rate of the environment change and, correspondingly, a limited capability of cell systems of coordinated adaptations to these changes are characteristic for the transitional stage.

Conclusions

The data obtained testify that the level of posthypertonic damage of erythrocytes is determined by entering the cell at the moment of rehydration of penetrating anions. With their absence in the medium DIDS, the inhibitor of anion transport, causes an increase of erythrocytes susceptibility to PHL.

References

1. *Bondarenko V.A., Bondarenko T.P., Rudenko S.V.* Dehydration effects in control of cold and osmotic cell susceptibility // *Problems of Cryobiology.*— 1992.— №4.— P. 14-26.
2. *Patelaros S.V.* A study of cation-dependent lysis of human blood rehydrated RBC // *Problems of Cryobiology.*— 1994.— №4.— P.31-37.
3. *Pesina N.I., Bondarenko V.A.* Medium osmolarity and the incubation duration as two independent factors, controlling erythrocytes susceptibility to cooling in the media, containing non-electrolyte // *Biochemical aspects of cryodamage and cryoprotection of cellular systems.*— Kharkov.— 1989.— P. 19-26.
4. *Rudenko S.V., Bondarenko V.A.* Role of the change of erythrocytes volume during post-hypertonic lysis // *Modelling of cryobiological processes.*— Kharkov.— 1988.— P. 55-67.
5. *Cabanthchik Z.I., Knauf P.A., Rothstein A.* The anion transport system of the red blood cell / The role of membrane protein evaluated by the use of probes // *BBA, Reviews on*

в средах с проникающими анионами дефектная структура мембраны станет причиной набухания клеток до объёма, превышающего нормальный. Если в условиях гипертонической инкубации клетка захватывает часть гипертонического раствора, то конечным эффектом будет набухание. В указанных условиях слабопроникающий или непроникающий анион может играть протектирующую роль, предотвращая процесс набухания клеток. Релаксационный механизм ПГЛ может заключаться в запаздывании объёмного восстановления цитоскелета на фоне быстрого увеличения объёма мембраны, что может стать причиной нестабильности или диссоциации компонентов скелета от мембраны в отдельных её участках. Для ПГЛ как и для гиперосмотического и холодового шоков, по-видимому, следует выделить и такой фактор, как наличие “переходного” этапа или этапа нестабильности при быстром изменении осмолярности среды, в которой находится клетка. Для переходного этапа характерна высокая скорость изменения внешних условий и соответственно ограниченная способность систем клетки к согласованным адаптациям к этим изменениям.

Выводы

Полученные результаты свидетельствуют о том, что уровень постгипертонического повреждения эритроцитов определяется поступлением в клетку в момент регидратации проникающих анионов, при отсутствии их в среде ингибитор анионного транспорта ДИДС вызывает увеличение чувствительности эритроцитов к ПГЛ.

Литература

1. Бондаренко В.А., Бондаренко Т.П., Руденко С.В. Эффекты дегидратации в контроле холодовой и осмотической чувствительности клеток // Пробл. криобиологии.– 1992.– № 4.– С. 14-26.
2. Пателарос С.В. Исследование катион-зависимого лизиса регидратированных эритроцитов крови человека // Пробл. криобиологии.– 1994.– № 4.– С. 31-37.
3. Песина Н.И., Бондаренко В.А. Осмолярность среды и продолжительность инкубации как два независимых фактора, контролирующих чувствительность эритроцитов к охлаждению в средах, содержащих неэлектролит // Биохимические аспекты криоповреждения и криозащиты клеточных систем. – Харьков,– 1989.– С. 19-26.
4. Руденко С.В., Бондаренко В.А. Роль изменения объёма эритроцитов при постгипертоническом лизисе // Моделирование криобиологических процессов.–Харьков,– 1988.– С. 55-67.
5. Cabanthechik Z.I., Knauf P.A., Rothstein A. The anion transport system of the red blood cell// The role of membrane proteins evaluated by the use of probes // BBA, Reviews on biomembranes.– 1978.– Vol. 515, № 3.– P. 239-302.
6. Clarke R.J., Lypfert C. Influence of anions and cations on the dipole potential of phosphatidylcholine vesicles: a basis for Hofmeister effect // Biophysical Journal.– 1999.– Vol. 76.– P. 2614-2624.
7. Daw A., Farrant J., Morris G. J. Membrane leakage of solutes after thermal shock or freezing // Cryobiology.– 1973.– Vol. 10, №1.– P.126-133.
8. Deuticke B. The role of membrane sulfhydryls in passive, mediated transport processes and for the barrier function of the erythrocyte membrane // Membrane biochemistry.–1986.– Vol.6, № 4.– P. 309-326.
9. Farrant J., Morris G. J. Thermal shock and dilution shock as the causes of freezing injury // Cryobiology.– 1973.– Vol.10, №2.– P.134-140.
10. Farrant J., Woolgar A. E. Human red cells under hypertonic conditions: a model system for investigating freezing damage 1. Sodium chloride // Cryobiology.– 1972.– Vol.9.– P. 9-15.
11. Farrant J., Woolgar A. E. Human red cells under hypertonic conditions: a model system for investigating freezing damage 2. Sucrose // Cryobiology.– 1972.– Vol.9.– P.16-21.
12. Haest C.V.M. Interactions between membrane skeleton proteins and the intrinsic membrane domains // BBA.– 1982.– № 4.– P. 331-352.
13. Heunbush P., Jung C.Y., Green F.A. The osmotic response of human erythrocytes and the membrane cytoskeleton // J. Cell. Physiol.– 1985.– Vol. 122, № 2.– P. 206-213.
14. Hsu L.I., Morrison M. The interaction of human erythrocyte band 3 with cytoskeletal components // Archives of Biochemistry and Biophysics. 1983.– Vol. 227, № 1.– P. 31-38.
15. Jennings M. Oligomeric structure and the anion transport function of human erythrocyte band 3 protein // J. Membrane Biol.– 1984.– Vol. 80.– P. 103-117.
16. Legrum B., Passow H. Inhibition of inorganic anion transport across the human red blood cell membrane by chloride-dependent association of dipyrindamole with a stibene disulfonate binding site on the band 3 protein // BBA, Biomembranes.– 1989.– № 2.– P. 193-207.
17. Meryman H. T. Modified model for the mechanism of freezing injury in erythrocytes // Nature.– 1968.– Vol.218.– P. 333-336.
18. Nishimura J.S., Narayanasami R., Millers R.T., Roman L.J. The stimulatory effects of Hofmeister ions on the activates of neuronal nitric-oxide synthase // J. of Biological Chemistry.– 1999.– № 9.– P. 5399-5406.
19. Rudenko S. V. Influence of cations on the inhibition of posthypertonic hemolysis of erythrocytes // Cryo-Letters.– 1994.– Vol.15.– P. 33-40.
20. Rudenko S. V., Patelaros S. V. Cation-sensitive pore formation in rehydrated erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta.– 1995.– Vol.1235.– P. 1-9.
21. Schnell K.F., Besl E., Mans A. Assymetry of chloride transport system in human erythrocyte chosts // European journal of physiology, Pflugers archiv.–1978.– Vol. 375.– P. 87-95.
22. Stokke B.T., Miikkelsen A., Elgsaeter A. The human erythrocyte membrane skeleton maybe an ionic gel. 1. Membrane mechanochemical propeties // Eur. Biophys. J.– 1986.– Vol. 13, № 4.– P. 203-219.
23. Woolgar A. E. Haemolysis of human red cells by freezing and thawing in solution containing sucrose: Relationship with posthypertonic haemolysis and solute movements // Cryobiology.– 1974.– Vol.11.– P.44-51.
24. Woolgar A. E., Morris C. J. Some combined effects of hypertonic solutions and changes in temperature on post-hypertonic haemolysis of human red blood cells //

7. Daw A., Farrant J., Morris G. J. Membrane leakage of solutes after thermal shock or freezing // *Cryobiology*.–1973.– Vol.10, №1.– P.126-133.
8. Deuticke B. The role of membrane sulfhydryls in passive, mediated transport processes and for the barrier function of the erythrocyte membrane // *Membrane biochemistry*.–1986.– Vol. 6, № 4.– P. 309-326.
9. Farrant J., Morris G. J. Thermal shock and dilution shock as the causes of freezing injury // *Cryobiology*.– 1973.– Vol.10, №2.– P.134-140.
10. Farrant J., Woolgar A. E. Human red cells under hypertonic conditions: a model system for investigating freezing damage 1. Sodium chloride // *Cryobiology*.– 1972.– Vol.9.– P.9-15.
11. Farrant J., Woolgar A. E. Human red cells under hypertonic conditions: a model system for investigating freezing damage 2. Sucrose // *Cryobiology*.– 1972.– Vol.9.– P.16-21.
12. Haest C.V.M. Interactions between membrane skeleton proteins and the intrinsic membrane domains // *BBA*.– 1982.– № 4.– P.331-352.
13. Heunbush P., Jung C.Y., Green F.A. The osmotic response of human erythrocytes and the membrane cytoskeleton // *J. Cell. Physiol*.– 1985.– Vol. 122, № 2.– P. 206-213.
14. Hsu L.I., Morrison M. The interaction of human erythrocyte band 3 with cytoskeletal components // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1983.– Vol. 227, № 1.– P. 31-38.
15. Jennings M. Oligomeric structure and the anion transport function of human erythrocyte band 3 protein // *J. Membrane Biol*.– 1984.– Vol. 80.– P. 103-117.
16. Legrum B., Passow H. Inhibition of inorganic anion transport across the human red blood cell membrane by chloride-dependent association of dipyrindamole with a stibene disulfonate binding site on the band 3 protein // *BBA, Biomembranes*.– 1989.– № 2.– P. 193-207.
17. Meryman H. T. Modified model for the mechanism of freezing injury in erythrocytes // *Nature*.– 1968.– Vol.218.– P. 333-336.
18. Nishimura J.S., Narayanasami R., Millers R.T., Roman L.J. The stimulatory effects of Hofmeister ions on the activities of neuronal nitric-oxide synthase // *J. of Biological Chemistry*.– 1999.–№ 9.–P. 5399-5406.
19. Rudenko S. V. Influence of cations on the inhibition of posthypertonic hemolysis of erythrocytes // *Cryo-Letters*.– 1994.– Vol.15.– P. 33-40.
20. Rudenko S. V., Patelaros S. V. Cation-sensitive pore formation in rehydrated erythrocytes // *Biochim. Biophys. Acta*.– 1995.– Vol.1235.– P.1-9.
21. Schnell K.F., Besl E., Mans A. Assymetry of chloride transport system in human erythrocyte ghosts // *European journal of physiology, Pflugers archiv*.– 1978.– Vol. 375.– P. 87-95.
22. Stokke B.T., Miikkelsen A., Elgsaeter A. The human erythrocyte membrane skeleton maybe an ionic gel. 1. Membrane mechanochemical properties // *Eur. Biophys. J*.– 1986.– Vol. 13, № 4.– P. 203-219.
23. Woolgar A. E. Haemolysis of human red cells by freezing and thawing in solution containing sucrose: Relationship with posthypertonic haemolysis and solute movements // *Cryobiology*.– 1974.– Vol.11.– P. 44-51.
24. Woolgar A. E., Morris C. J. Some combined effects of hypertonic solutions and changes in temperature on post-hypertonic haemolysis of human red blood cells // *Cryobiology*.– 1973.– Vol.10. – P. 82-86.

hypertonic haemolysis of human red blood cells // *Cryobiology*.– 1973.– Vol.10.– P. 82-86.

Accepted in 25.02.2003

Поступила 25.02.2003