

## Влияние хлорида алюминия и различных криопротекторов на развитие гипертонического криогемолиза эритроцитов человека

Я.О. НАРДИД<sup>1</sup>, Н.А. ДАНИЛЕНКО<sup>2</sup>, В.В. РАМАЗАНОВ<sup>1</sup>, В.А. БОНДАРЕНКО<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

<sup>2</sup>Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

## Effect of Aluminum Chloride and Different Cryoprotectants on Hypertonic Cryohemolysis Development in Human Erythrocytes

YA.O. NARDID<sup>1</sup>, N.A. DANILENKO<sup>2</sup>, V.V. RAMAZANOV<sup>1</sup>, V.A. BONDARENKO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

<sup>2</sup>V.N. Karazin Kharkiv National University

Исследовали особенности развития гипертонического криогемолиза эритроцитов человека при охлаждении от 37 до 0°C при действии различных криопротекторов и хлорида алюминия. Установлено, что присутствие в среде инкубации ПЭГ-1500, а также хлорида алюминия заметно повышает устойчивость клеток к температурно-осмотическим воздействиям. Использование проникающих криопротекторов приводит к повышению уровня гипертонического криогемолиза на второй стадии инкубации в гипертонических условиях.

**Ключевые слова:** эритроциты, гипертонический криогемолиз, криопротектор.

Досліджували особливості розвитку гіпертонічного криогемолізу еритроцитів людини при охолодженні від 37 до 0°C при дії різних криопротекторів і хлориду алюмінію. Встановлено, що присутність у середовищі інкубації ПЕГ-1500, а також хлориду алюмінію помітно підвищує стійкість клітин до температурно-осмотичних впливів. Використання проникаючих криопротекторів приводить до підвищення рівня гіпертонічного криогемолізу на другій стадії інкубації в гіпертонічних умовах.

**Ключові слова:** еритроцити, гіпертонічний криогемолиз, криопротектор.

The peculiarities of development of hypertonic cryohemolysis of human erythrocytes at cooling from 37 down to 0°C under the influence of different cryoprotectors and aluminum chloride were investigated. It was established, that the presence of PEG-1500 and also aluminum chloride in the medium noticeably enhanced the stability of cells to temperature-osmotic effects. The use of penetrating cryoprotectors leads to increasing of hypertonic cryohemolysis level at the second stage of incubation in hypertonic conditions.

**Key-words:** erythrocytes, hypertonic cryohemolysis, cryoprotectant.

Гипертонический криогемолиз – это лизис эритроцитов в процессе охлаждения в гипертонических средах при положительных температурах. Полагают, что развитие чувствительности эритроцитов к охлаждению в интервале температур 37-0°C в гипертонических условиях связано с изменением специфических контактов белков цитоскелета с мембраной [5, 9], а также с развитием фазовых переходов в липидном бислое мембраны [1, 4, 13]. Соответственно действие соединений, способных значительно повлиять на процесс гипертонического криогемолиза, реализуется как на уровне структурных перестроек мембраны и цитоскелета, так и на уровне изменений состояния бислоя. Известно, что криозащитные соединения ДМСО, глицерин, ПЭГ и др. оказывают существенное влияние на структурные и функциональные свойства биологических мембран [1], что может проявляться в изменении характера холодовой чувствительности клеток. Помимо криопротекторов известна группа соединений различной химической природы

**Адрес для корреспонденции:** Нардид Я.О., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-41, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Hypertonic cryohemolysis is erythrocyte lysis during cooling in hypertonic media under positive temperatures. Development of erythrocyte sensitivity to cooling within temperature range of 37-0°C under hypertonic conditions is thought to be associated with a change in specific contacts of cytoskeletal proteins with a membrane [5, 9], as well as with phase transitions' development in membrane lipid bilayer [4, 13]. Correspondingly, the effect of compounds, capable to considerably affect the process of hypertonic cryohemolysis is realised both at the level of membrane and cytoskeleton structural rearrangements and at the one of changes in bilayer state. Cryoprotective compounds (DMSO, glycerol, PEG etc.) are known to cause a significant effect on structural and functional properties of biological membranes [1], that can be manifested in a change of character of cell cold sensitivity. In addition to cryoprotectants there is known the group of compounds of different chemical nature (amphiphilic compounds, anaesthetics, bivalent ions etc.), which under certain concentrations considerably change cell sensitivity to temperature-osmotic effects

**Address for correspondence:** Nardid Ya.O., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3141, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

(амфифильные соединения, анестетики, двухвалентные ионы и др.), которые при определенных концентрациях значительно изменяют чувствительность клеток к температурно-осмотическим воздействиям [6]. К таким соединениям можно отнести соли алюминия, которые оказывают выраженное модифицирующее действие на клетки и клеточные структуры [16, 18]. В то же время механизм клеточной активности ионов алюминия во многом остается неясным. Одним из факторов реализации эффектов ионов алюминия на субклеточном уровне является взаимодействие их с липидным матриксом мембраны [16], что может оказывать воздействие на холодовую чувствительность клеток.

Целью данного исследования являлось изучение особенностей развития гипертонического криогемолиза эритроцитов человека в присутствии различных криопротекторов, а также хлорида алюминия.

### Материалы и методы

В экспериментах использовали эритроциты донорской крови II группы. Эритромассу трижды отмывали центрифугированием при 1500g в течение 3-х минут десятикратным объемом раствора, содержащего 0,15 моль/л NaCl и 10 ммоль/л трис-буфера (pH 7,4), и хранили в виде плотного осадка не более 2-х часов при температуре 0°C. Все используемые среды готовили на 10 ммоль/л трис (pH 7,4). В работе применяли ПЭГ-1500 производства фирмы "Merck" и реактивы отечественного производства квалификации "чда".

Гипертонический криогемолиз осуществляли инкубированием эритроцитов в 1,2 моль/л NaCl при температуре 37°C в течение 0-60 мин и последующем охлаждении до 0°C (5 мин). Конечный гематокрит составил 0,5%. Непроницающий крипротектор и хлорид алюминия добавляли в раствор 1,2 моль/л NaCl перед внесением клеток. Для насыщения эритроцитов проникающими криопротекторами (глицерин, 1,2-пропандиол (1,2-ПД), ДМСО, ПЭГ-400) клетки предварительно инкубировали в растворе, содержащем 150 ммоль/л NaCl, 10 ммоль трис-буфера и 5%-й раствор соответствующего криопротектора (pH 7,4) в течение 30 мин при 37°C.

Клетки осаждали центрифугированием в течение 3-х минут при 1500g. Уровень свободного гемоглобина в супернатанте регистрировали спектрофотометрическим способом на СФ-4А с проточной кюветой при длине волны 543 нм. Выход гемоглобина из клетки рассчитывали в процентах относительно 100%-го гемолиза эритроцитов в присутствии 0,1% -го раствора тритона X-100.

[6]. Aluminum salts, which cause a manifested modifying effect on cell and its structures can be referred to such compounds [16, 18]. At the same time the mechanism of cell activity of aluminum ions is mainly unclear. One of the factors of aluminum ions effect realisation on a subcellular level is their interaction with membrane lipid matrix [16] that can affect a cold sensitivity of cells.

This research was aimed to study the peculiarities of hypertonic cryohemolysis development of human erythrocytes in the presence of different cryoprotectants and aluminum chloride as well.

### Materials and methods

Erythrocytes of A(II) donor blood were used in the experiment. Erythromass was thrice washed-out by centrifugation at 1500g during 3 min with 10-fold volume of the solution, contained 0.15 mol/l NaCl and 10 mmol/l Tris-buffer (pH 7.4) and stored as a dense sediment not more than 2 hrs at 0°C. All used media were prepared with 10 mmol/l Tris (pH 7.4). PEG-1500 ("Merck") and home produced reagents of "pure for analysis" grade were used in the work.

Hypertonic cryohemolysis was realised by incubating erythrocytes in 1.2 mol/l NaCl at 37°C for 0-60 min and following cooling down to 0°C (5 min). Final hematocrit made 0.5%. Non-penetrative cryoprotectants and aluminum chloride were added into 1.2 mol/l NaCl solution before cell introduction. For saturating erythrocytes with penetrative cryoprotectants (glycerol, 1,2-propanediol (1,2-PD), DMSO, PEG-400) cells were preliminarily incubated in the solution, contained 150 mmol/l NaCl, 10 mmol Tris-buffer and 5% solution of corresponding cryoprotectant (pH 7.4) for 30 min at 37°C.

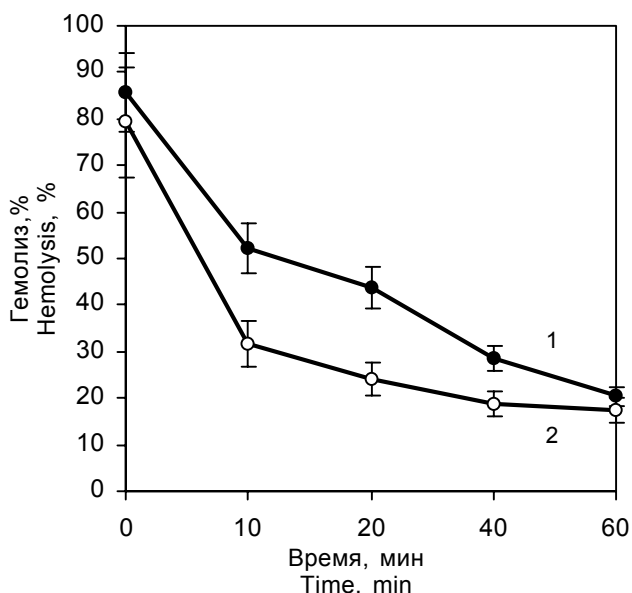
Cells were precipitated by centrifugation for 3 min at 1500g. The level of free hemoglobin in supernatant was spectrophotometrically registered with SP-4A with flow cuvette at 543 nm wavelength. Hemoglobin release out of a cell was calculated in percentage in respect of 100% erythrocyte hemolysis at the presence of 0.1% triton X-100 solution.

### Results and discussion

Fig.1 shows the data on erythrocyte hypertonic cryohemolysis development under cooling from 37 down to 0°C at the presence of 20% non-penetrative cryoprotectant solution PEG-1500. During cooling in hypertonic saline medium (1.2 mol/l NaCl) a non-penetrative cryoprotectant is seen to decrease the level of erythrocyte hemolysis in all studied interval of incubation. Observed dynamics of hypertonic cryohemolysis development in electrolyte medium may depend on following factors. During erythrocyte

## Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены данные о развитии гипертонического криогемолиза эритроцитов при охлаждении от 37 до 0°C в присутствии 20%-го раствора непроницающего криопротектора ПЭГ-1500. Видно, что при охлаждении в гипертонической солевой среде (1,2 моль/л NaCl) непроницающий криопротектор снижает уровень гемолиза эритроцитов во всем исследуемом интервале инкубации. Наблюдаемая динамика развития гипертонического криогемолиза в электролитной среде может зависеть от следующих факторов. В процессе инкубации эритроцитов в гипертонической среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl, происходит освобождение ионов K<sup>+</sup>, которое достигает максимума к 20-й минуте инкубации [10]. Соответственно вследствие быстрой потери ионов K<sup>+</sup> происходит уменьшение объёма клеток, что может привести к модификации барьерной функции мембраны и появлению короткоживущих дефектов бислоя, проницаемых для ионов Na<sup>+</sup>. Поступление ионов Na<sup>+</sup>, сопровождающееся увеличением объёма, может рассматриваться как фактор, приводящий к снижению чувствительности эритроцитов к охлаждению [11]. В конечном итоге в результате поступления ионов Na<sup>+</sup> может иметь место восстановление осмотического градиента на мембране, что возможно является протектирующим фактором, понижающим действие солевой гипертонической среды по мере увеличения продолжительности инкубации клеток [11].

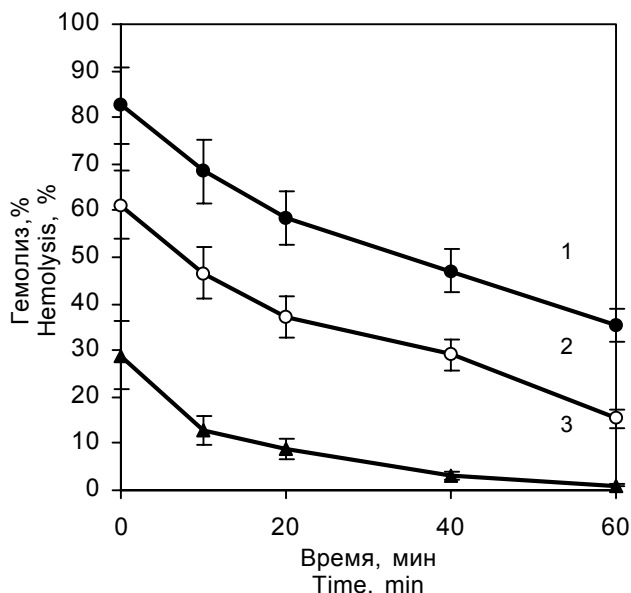


**Рис. 1.** Влияние ПЭГ-1500 и времени инкубации при 37°C на гипертонический криогемолиз эритроцитов в 1,2 моль/л NaCl: 1 – контроль; 2 – 20%-й ПЭГ-1500.

**Fig. 1.** Effect of PEG-1500 and incubation time at 37°C on erythrocyte hypertonic cryohemolysis in 1.2 mol/l NaCl: 1 – control; 2 – 20% PEG-1500.

incubation in hypertonic 1.2 mol/l NaCl-contained medium there is K<sup>+</sup> ions release, which reaches the maximum to the 20<sup>th</sup> min of incubation [10]. Correspondingly, due to a rapid K<sup>+</sup> ion loss there is a reduction of cell volume, that may result in modification of membrane barrier function and appearance of short-living bilayer defects, being penetrative for Na<sup>+</sup> ions. Entering of Na<sup>+</sup> ions, being accompanied by cell volume increase can be considered as the factor, resulting in a decrease of erythrocyte sensitivity to cooling [11]. Finally, as a result of Na<sup>+</sup> ion entering the recovery of osmotic gradient on a membrane can occur, being probably a protecting factor, which decreases the effect of saline hypertonic medium with an increase in duration of cell incubation [11].

Reduction of the level of cell lysis in PEG-1500-contained medium is explained by the effect nature of non-penetrative cryoprotectant, which mechanism is related to state modification of membrane lipid phase, dehydration of phospholipid polar groups and augmentation of membrane hydrophobicity [12, 14, 15]. As the level of erythrocyte destruction by the mechanism of temperature-osmotic shock is proportional to osmotic gradient, the one of possible ways of cell adaptation to temperature effect is a decrease in the value of osmotic gradient on a membrane in medium with cryoprotectant [7]. PEG-1500 presence in the medium causes a dehydrating effect, results in an increase of cytosol viscosity and a change in cytoskeletal protein state [2], that can



**Рис. 2.** Влияние хлорида алюминия и времени инкубации при 37°C на гипертонический криогемолиз эритроцитов в 1,2 моль/л NaCl: 1 – контроль; 2 – 0,3 ммоль/л AlCl<sub>3</sub>; 3 – 1 ммоль/л AlCl<sub>3</sub>.

**Fig. 2.** Effect of aluminum chloride and incubation time at 37°C on erythrocyte hypertonic cryohemolysis in 1.2 mol/l NaCl: 1 – control; 2 – 0.3 mmol/l AlCl<sub>3</sub>; 3 – 1 mmol/l AlCl<sub>3</sub>.

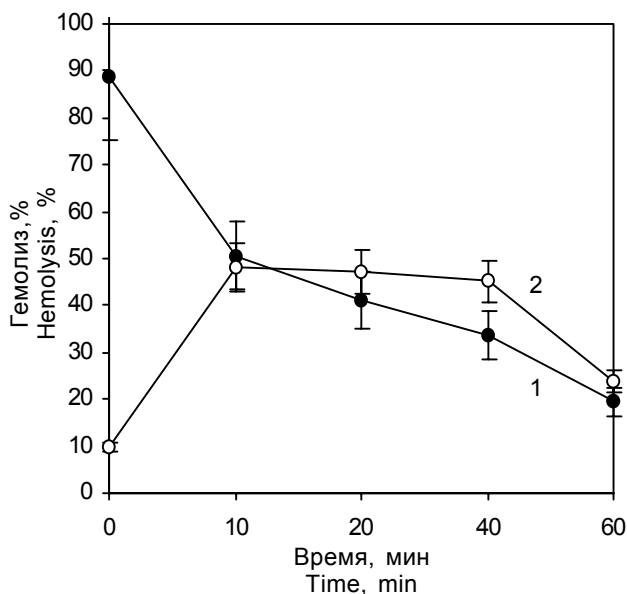
Снижение уровня лизиса клеток в среде, содержащей ПЭГ-1500, объясняется природой действия непроникающего криопротектора, механизм которого связан с модификацией состояния липидной фазы мембраны, дегидратацией полярных групп фосфолипидов и увеличением гидрофобности мембраны [12, 14, 15]. Так как уровень разрушения эритроцитов по механизму температурно-осмотического шока пропорционален осмотическому градиенту, то одним из возможных способов адаптации клеток к температурному воздействию может быть уменьшение величины осмотического градиента на мембране в среде с криопротекторами [7]. Присутствие в среде ПЭГ-1500 вызывает дегидратирующий эффект, приводит к увеличению вязкости цитозоля и изменению состояния белков цитоскелета [2], что может оказывать влияние на чувствительность эритроцитов к охлаждению. Так, в работе [3] показано, что чувствительность эритроцитов к гипертоническому криогемолизу существенно зависит от состояния цитоскелет-мембранного комплекса. Это подтверждается тем, что гемин, нарушающий взаимодействие белка 4.1 с мембраной, значительно снижает уровень гипертонического криогемолиза [8].

На рис. 2 представлены данные о влиянии различных концентраций хлорида алюминия на устойчивость эритроцитов человека к гипертоническому криогемолизу. Хлорид алюминия, как и ПЭГ-1500, не вызывает изменения динамики развития гипертонического криогемолиза, хотя

affect erythrocyte sensitivity to cooling. Thus, in the paper [3] the erythrocyte sensitivity to hypertonic cryohemolysis is shown to significantly depend on the state of cytoskeleton-membrane complex. This is confirmed by the fact, that hemin, impairing 4.1 protein interaction with a membrane, considerably reduces the level of hypertonic cryohemolysis [8].

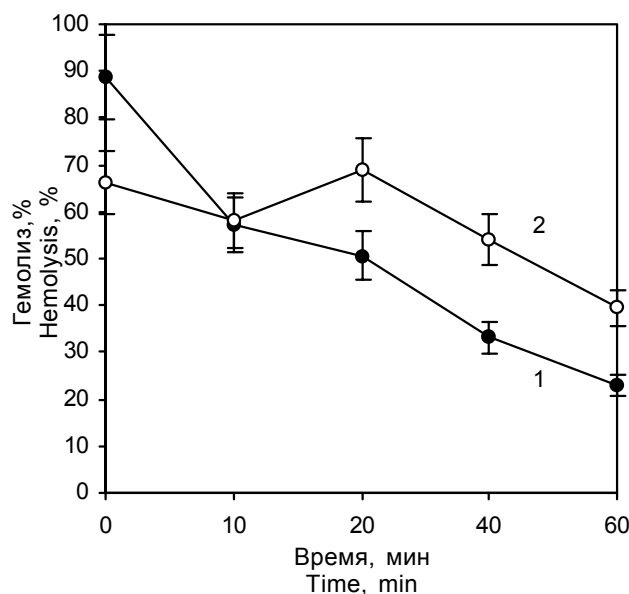
Fig. 2 demonstrates the data on the effect of aluminum chloride different concentrations on human erythrocyte resistance to hypertonic cryohemolysis. Both aluminum chloride and PEG-1500 do not cause a change in dynamics of hypertonic cryohemolysis development, though the level of cell lysis reduces. The lower erythrocyte sensitivity to hypertonic cryohemolysis is, the higher aluminum chloride concentration in incubation medium is.  $Al^{3+}$  ions are known to modify membrane sites, enriched with phosphatidylcholine and in a less extent with phosphatidyl ethanolamine, to induce echinocyte formation [17, 18]. We can assume, that aluminum chloride by decreasing membrane hydrophobicity changes its barrier function, that contributes to osmotic gradient dissipation on a membrane and a decrease in erythrocyte sensitivity to cooling within temperature range of 37-0°C.

In the work there was also investigated a hypertonic cryohemolysis of human erythrocytes under the effect of penetrative cryoprotectants and those of mixed type, to which PEG-400 can be referred (such substances can comprise a certain part of low molecular fractions, penetrating into cells, meanwhile a part of polymer remains in extracellular



**Рис. 3.** Влияние ПЭГ-400 и времени инкубации при 37°C на гипертонический криогемолиз эритроцитов в 1,2 моль/л NaCl: 1 – контроль; 2 – 5%-й ПЭГ-400.

**Fig. 3.** Effect of PEG-400 and incubation time at 37°C on erythrocyte hypertonic cryohemolysis in 1.2 mol/l NaCl: 1 – control; 2 – 5% PEG-400.



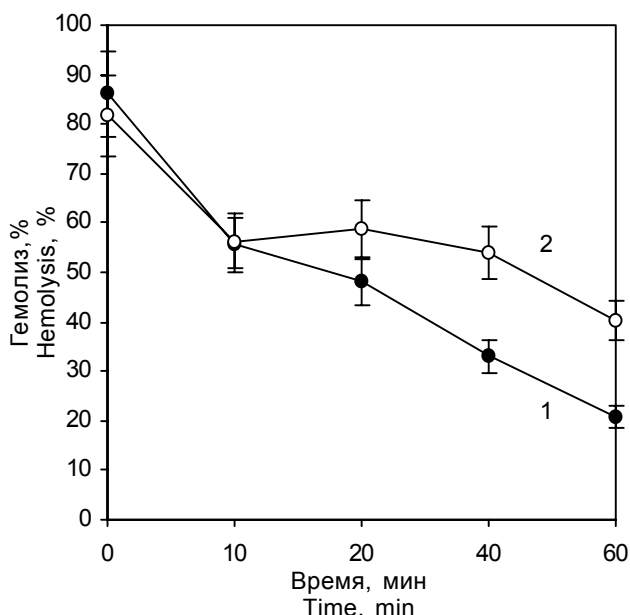
**Рис. 4.** Влияние 1,2-ПД и времени инкубации при 37°C на гипертонический криогемолиз эритроцитов в 1,2 моль/л NaCl: 1 – контроль; 2 – 5%-й 1,2-ПД.

**Fig. 4.** Effect of 1,2-PD and incubation time at 37°C on erythrocyte hypertonic cryohemolysis in 1.2 mol/l NaCl: 1 – control; 2 – 5% 1,2-PD.

уровень лизиса клеток при этом снижается. Чувствительность эритроцитов к гипертоническому криогемолизу тем ниже, чем выше концентрация хлорида алюминия в среде инкубации. Известно, что ионы  $Al^{3+}$  модифицируют участки мембраны, обогащённые фосфатидилхолином и в меньшей степени фосфатидилэтаноломином, индуцируют формирование эхиноцитов [17, 18]. Можно предположить, что хлорид алюминия, снижая гидрофобность мембраны, модифицирует её барьерную функцию, что способствует диссипации осмотического градиента на мембране и снижению чувствительности эритроцитов к охлаждению в интервале температур 37-0°C.

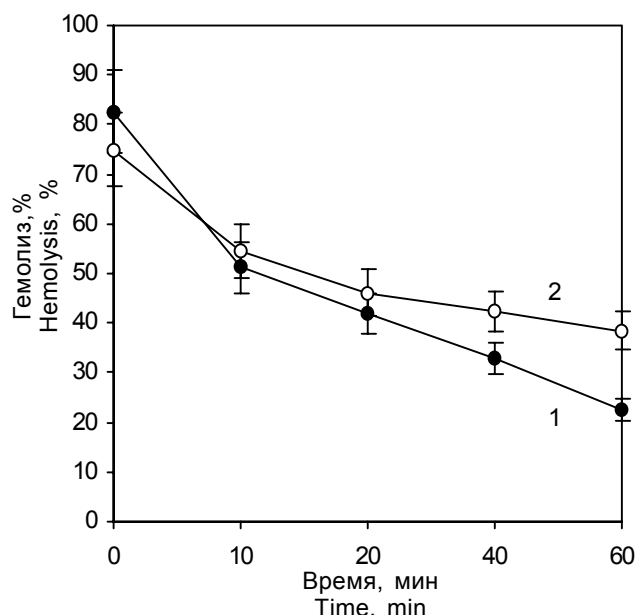
В работе был исследован также гипертонический криогемолиз эритроцитов человека при действии проникающих криопротекторов и криопротекторов смешанного типа, к которым можно отнести ПЭГ-400 (подобные вещества могут в своем составе содержать определенную долю низкомолекулярных фракций, которые проникают в клетки, в то время как часть полимера остается во внеклеточной среде) [1]. Видно, что присутствие в среде инкубации криопротекторов этой группы изменяет развитие гипертонического криогемолиза во времени. На начальном этапе инкубации наблюдается снижение чувствительности эритроцитов, однако, начиная с 10-й минуты, чувствительность клеток к гипертоническому криогемолизу возрастает. В средах, содержащих 5%-й ПЭГ-400 (рис. 3), имеет место значительное

medium) [1]. Presence of cryoprotectants of this group in incubation medium is seen to change the development of hypertonic cryohemolysis in time. At initial state of incubation a decrease in erythrocyte sensitivity is observed, but starting from the 10<sup>th</sup> min a cell sensitivity to hypertonic cryohemolysis augments. In the media, contained 5% PEG-400 (Fig. 3) there is a significant decrease in the level of hypertonic cryohemolysis at the initial state of incubation (0-10 min). Then the augmentation of hemolysis level is noted. Similar dynamics for hypertonic cryohemolysis development is observed at the presence of 5% 1.2-PD (Fig.4), but a degree of hemolysis reduction at the initial stage of erythrocyte incubation is less manifested. In the media, contained such cryoprotectants as DMSO, 5% glycerol (Fig. 5, 6), a slight decrease in erythrocyte sensitivity to hypertonic cryohemolysis at the initial stage of incubation and an increase in hemolysis level at later stages were noted. Penetrative cryoprotectants prevent dehydration of intracellular content and within concentration range of 1-5% cause a slight effect on cell membrane fluidity near its surface, although in a certain extent they slow down the mobility of polar areas of lipid bilayer [1]. Cryoprotectants of this group can be assumed as changing erythrocyte membrane structure with simultaneous additional cell dehydration at later incubation stages. This possibly explains the augmentation of erythrocyte sensitivity to hypertonic cryohemolysis at an increase in their incubation time.



**Рис.5.** Влияние ДМСО и времени инкубации при 37°C на гипертонический криогемолиз эритроцитов в 1,2 моль/л NaCl: 1 – контроль; 2 – 5%-й ДМСО.

**Fig. 5.** Effect of DMSO and incubation time at 37°C on erythrocyte hypertonic cryohemolysis in 1.2 mol/l NaCl: 1 – control; 2 – 5% DMSO.



**Рис. 6.** Влияние глицерина и времени инкубации при 37°C на гипертонический криогемолиз эритроцитов в 1,2 моль/л NaCl: 1 – контроль; 2 – 5%-й глицерин.

**Fig. 6.** Effect of PEG-400 and incubation time at 37°C on erythrocyte hypertonic cryohemolysis in 1.2 mol/l NaCl: 1 – control; 2 – 5% glycerol.

снижение уровня гипертонического криогемолиза на начальном этапе инкубации (0-10 мин). В дальнейшем отмечается повышение уровня гемолиза. Сходная динамика развития гипертонического криогемолиза наблюдается в присутствии 5%-го 1,2-ПД (рис. 4), однако степень снижения гемолиза на начальном этапе инкубации эритроцитов менее выражена. В средах, содержащих такие криопротекторы, как ДМСО, глицерин в концентрации 5% (рис. 5, 6), отмечено незначительное снижение чувствительности эритроцитов к гипертоническому криогемолизу на начальном этапе инкубации и возрастание уровня гемолиза на более поздних этапах. Проникающие криопротекторы предотвращают дегидратацию внутриклеточного содержимого и в диапазоне концентраций 1-5% оказывают слабое воздействие на текучесть мембраны клеток вблизи ее поверхности, хотя в определенной степени тормозят подвижность полярных областей липидного бислоя [1]. Можно предположить, что криопротекторы данной группы изменяют структуру мембран эритроцитов с одновременной дополнительной дегидратацией клеток на более поздних этапах инкубации. Это, возможно, объясняет повышение чувствительности эритроцитов к гипертоническому криогемолизу при увеличении продолжительности их инкубации.

### Выводы

Присутствие в среде непроникающего криопротектора ПЭГ-1500, а также хлорида алюминия заметно снижает чувствительность эритроцитов человека к гипертоническому криогемолизу, причем защитное действие рассмотренных веществ может опосредоваться их влиянием как на липидный матрикс, так и на белки цитоскелета. В то же время проникающие криопротекторы изменяют характер развития гипертонического криогемолиза эритроцитов во времени, что может объясняться изменением структурного состояния мембраны и дополнительной дегидратацией клеток.

### Литература

1. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. – Киев: Наук. думка.– 1994.– 432 с.
2. Белоус А.М., Гулевский А.К., Бабийчук Л.А. и др. Роль белков цитоскелета в изменении стабильности клеток при температурно-осмотическом воздействии // Криобиология.– 1990.– №4. – С. 3-13.
3. Бондаренко В.А. Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов: Автореф. дис... докт. биол. наук.– Харьков, 1988.– 30 с.
4. Гордиенко Е.А., Коваленко С.Е. Основные закономерности явления гипертонического криогемолиза // Пробл. криобиологии.– 1997.– №3.– С. 3-7.

### Conclusions

Presence of non-penetrative cryoprotectant PEG-1500 and aluminum chloride considerably decreases human erythrocyte sensitivity to hypertonic cryohemolysis, moreover a protective effect of considered substances can be mediated by their influence on both lipid matrix and cytoskeleton proteins. At the same time penetrative cryoprotectants change the character of erythrocyte hypertonic cryohemolysis development in time, that can be explained by a change in membrane structural state and additional cell dehydration.

### References

1. Belous A.M., Grischenko V.I. Cryobiology.– Kiev: Naukova Dumka, 1994.– 432 p.
2. Belous A.M., Gulevsky A.K., Babijchuk L.A. et al. Role of cytoskeletal proteins in changing cell stability at temperature-osmotic effect // Kriobiologiya.– 1990.– N4.– P. 3-13.
3. Bondarenko V.A. Development and prevention of erythrocyte temperature shock: Author's abstract of thesis for doctor's degree obtaining (biology).– Kharkov, 1988.– 30 p.
4. Gordienko E.A., Kovalenko S.E. Basic rules of the event of posthypertonic cryohemolysis // Problems of Cryobiology.– 1997.– N3.– P. 3-7.
5. Kudokotseva E.V., Ramazanov V.V., Timchenko L.N. et al. Action of modifiers on the structural spectrum of the cytoskeletal proteins of human red cells // Problems of cryobiology.– 1998.– N4.– P. 22-25.
6. Kuleshova L.G., Orlova N.V., Shpakova N.M. Antihemolytic and transforming activity of amphiphilic compounds // Problems of Cryobiology.– 2001.– N1.– P. 9-15.
7. Moiseyev V.A., Zinchenko V.D., Nardid O.A. About some molecular mechanisms of biological object cryoprotection// Physical and chemical processes in cryobiological systems.– Kharkov, 1991.– P. 78-92.
8. Ramazanov V.V. Effect of osmotic stress and different cytoskeletal modifiers on cold and hypertonic shock development: Author's abstract of thesis for candidate degree obtaining (biology).– Kharkov, 1993.– 14 p.
9. Ramazanov V.V., Bondarenko V.A. Action of hemin and DIDS on cold and hypertonic stress of red blood cells // Problems of Cryobiology.– 1996.– N2.– P. 13-17.
10. Ramazanov V.V., Bondarenko V.A. Comparative study of the cold and hypertonic stress of RBC in the NaCl solutions// Problems of Cryobiology.– 1996.– N1.– P. 34-36.
11. Shpakova N.M., Bondarenko V.A. Erythrocyte sensitivity to cold shock in salts and non-electrolytes-contained media// Problems of Cryobiology.– 1992.– N3.– P. 15-19.
12. Aldwinckle T.J., Ahkong Q.F., Bangham A.D. et al. Effect of polyethylene on liposomes and erythrocytes. Permeability changes and membrane fusion // Biochim. Biophys. Acta.– 1982.– Vol. 689, N3.– P. 548-560.
13. Green F.A., Jung C.Y. Cold-induced hemolysis in a hypertonic milieu // J. Membr. Biol.– 1977.– Vol. 33, N3-4.– P. 249-262.
14. Lehtonen J.Y., Kinnunen P.K. Poly(ethylene glycol)-induced and temperature-dependent phase separation in fluid binary phospholipid membranes // Biophys. J.– 1995.– Vol. 68, N2.– P. 525-535.
15. Ohki S., Arnold K. Surface dielectric constant, surface hydrophobicity and membrane fusion // J. Membrane Biol.– 1990.– Vol. 144, N3.– P.195-203.
16. Suwalsky M., Ungerer B., Villena F. et al. Effects of AlCl<sub>3</sub> on toad skin, human erythrocytes and model cell membranes// Brain Res. Bull.– 2001.– Vol. 55, N2.– P. 205-210.

5. Кудокоцева Е.В., Рамазанов В.В., Тимченко Л.Н. и др. Влияние модификаторов цитоскелета на структурный спектр белков цитоскелета эритроцитов человека // Пробл. криобиологии. – 1998. – №4. – С. 22-25.
6. Кулешова Л.Г., Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Антигемолитическая и трансформирующая активность амфифильных соединений // Пробл. криобиологии. – 2001. – №1. – С. 9-15.
7. Моисеев В.А., Зинченко В.Д., Хардид О.А. О некоторых молекулярных механизмах криозащиты биологических объектов // Физико-химические процессы в криобиологических системах: Сб. статей. – Харьков, 1991. – С. 78-92.
8. Рамазанов В.В. Влияние осмотического стресса и различных модификаторов цитоскелета на развитие холодогового и гипертонического шока: Автореф. дис... канд. биол. наук. – Харьков, 1993. – 14 с.
9. Рамазанов В.В., Бондаренко В.А. Действие гемина и ДИДС на холодоговой и гипертонический шок эритроцитов // Пробл. криобиологии. – 1996. – №2. – С. 13-17.
10. Рамазанов В.В., Бондаренко В.А. Сравнительное исследование холодогового и гипертонического шока эритроцитов в растворе NaCl // Пробл. криобиологии. – 1996. – №1. – С. 34-36.
11. Шпакова Н.М., Бондаренко В.А. Чувствительность эритроцитов к холодоговому шоку в средах, содержащих соли и неэлектролиты // Пробл. криобиологии. – 1992. – №3. – С. 15-19.
12. Aldwinckle T.J., Ahkong Q.F., Bangham A.D., Fiser D., Lucy J.A. Effect of poly(ethylene glycol) on liposomes and erythrocytes. Permeability changes and membrane fusion // Biochim. Biophys. Acta. – 1982. – Vol. 689, №3. – P. 548-560.
13. Green F.A., Jung C.Y. Cold-induced hemolysis in a hypertonic milieu // J. Membr. Biol. – 1977. – Vol. 33, N3-4. – P. 249-262.
14. Lehtonen J.Y., Kinnunen P.K. Poly(ethylene glycol)-induced and temperature-dependent phase separation in fluid binary phospholipid membranes // Biophys. J. – 1995. – Vol. 68, N2. – P. 525-535.
15. Ohki S., Arnold K. Surface dielectric constant, surface hydrophobicity and membrane fusion // J. Membrane Biol. – 1990. – Vol. 144, N3. – P.195-203.
16. Suwalsky M, Ungerer B, Villena F, Norris B, Cardenas H, Zatta P. Effects of AlCl<sub>3</sub> on toad skin, human erythrocytes, and model cell membranes // Brain Res. Bull. – 2001. – Vol.55, N2. – P. 205-210.
17. Takahashi T., Williams R. J. Thermal shock hemolysis in human red cells. 1. The effect of temperature, time and osmotic stress // Cryobiology. – 1983. – Vol.20, N5. – P. 507-520.
18. Weis C., Haug A. Aluminum-altered membrane dynamics in human red blood cell white ghosts // Thromb. Res. – 1989. – Vol.15, N54. – P.141-149.

*Accepted in 23.03.2005*

*Поступила 23.03.2005*