

## Сравнительное исследование чувствительности предварительно обезвоженных эритроцитов человека и быка к гипертоническому стрессу

UDC 57.043:591.111.1

D.I. ALEKSANDROVA\*, N.V. ORLOVA, N.M. SHPAKOVA

## Comparative Study of Preliminarily Dehydrated Human and Bovine Erythrocyte Sensitivity to Hypertonic Stress

Предварительная инкубация эритроцитов человека в 0,4 М и быка в 1,0 М NaCl приводит к формированию устойчивого состояния клеток к действию 4,0 М NaCl. Показано, что максимальное сжатие эритроцитов на этапе предварительной инкубации в средах умеренной гипертонии коррелирует с минимальным уровнем гемолиза при перенесении клеток в среду, содержащую 4,0 М NaCl. При 37°C уровень минимального гипертонического гемолиза и значение минимального гематокрита эритроцитов быка ниже, чем аналогичные величины, полученные для эритроцитов человека. Снижение температуры эксперимента до 0°C по сравнению с 37°C приводит к уменьшению уровня гемолиза и объема эритроцитов человека.

**Ключевые слова:** эритроциты человека и быка, гиперосмотический стресс, предварительное обезвоживание клеток, гематокрит.

Попередня інкубація еритроцитів людини у 0,4 М і быка у 1,0 М NaCl приводить до формування стійкого стану клітин до подальшої дії 4,0 М NaCl. Показано, що максимальне стиснення еритроцитів на етапі попередньої інкубації у середовищах помірної гіпертонії корелює з мінімальним рівнем гемолізу при перенесенні клітин у середовище, яке містить 4,0 М NaCl. При 37°C рівень мінімального гіпертонічного гемолізу і значення мінімального гематокриту еритроцитів быка нижче, ніж аналогічні величини, одержані для еритроцитів людини. Зниження температури експерименту до 0°C в порівнянні з 37°C приводить до зменшення рівня гемолізу і об'єму еритроцитів людини.

**Ключові слова:** еритроцити людини і быка, гіперосмотичний стрес, попереднє зводнення клітин, гематокрит.

Preliminary incubation of human and bovine erythrocytes in 0.4 and 1.0 M NaCl, correspondingly, results in the formation of a resistant cell state to the following 4.0 M NaCl effect. Maximum erythrocyte shrinking at the stage of preliminary incubation in moderately hypertonic media was shown as correlating with the minimum hemolysis level under cell transfer into 4.0 M NaCl-containing medium. At 37°C the level of minimum hypertonic hemolysis and minimum hematocrit value for bovine erythrocytes is lower than the similar ones, obtained for human erythrocytes. The reduction of experimental temperature down to 0°C results in hemolysis level and human erythrocyte volume decrease compared to 37°C.

**Key-words:** human and bovine erythrocytes, hyperosmotic stress, preliminary cell dehydration, hematocrit.

При низкотемпературном консервировании клеточных суспензий на клетки действуют такие неблагоприятные факторы, как высокие концентрации солей, сдвиг температуры, изменение pH и др. [2]. Полагают, что гипертонический стресс является одним из основных факторов криповреждения [3]. Поэтому перенесение эритроцитов в высококонцентрированные солевые растворы при положительных температурах используют для моделирования ситуации, возникающей в процессе замораживания, и поиска способов предотвращения повреждения клеток.

Так, насыщение эритроцитов человека глюкозой [5], дозированное добавление криопротектора ПЭО-1500 при температуре 0°C [1], а также предварительная инкубация этих клеток в умеренно гипертонических растворах способствуют повы-

Under cell suspension low temperature preservation such unfavourable factors as high salt concentrations, temperature shift, pH change etc [2]. affect the cells. Hypertonic stress is believed to be one of the main cryodamage factors [3]. Therefore the erythrocyte transfer into high-concentrated salines under positive temperatures is used to model the situation occurring under freezing and to search the ways for cell damage prevention.

Thus, the human erythrocyte saturation with glucose [5], a dosed PEO-1500 adding at 0°C [1], as well as these cells preliminary incubation in moderately hypertonic solutions contribute to their increased resistance to hypertonic stress [6].

Hypertonic stress of human erythrocytes is quite studied [2, 3, 6], therefore of interest was to investigate its peculiarities for other mammalian erythrocytes,

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38  
(057) 373-41-35, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:  
cryo@online.kharkov.ua

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 4135, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

шению их устойчивости к гипертоническому шоку [6].

Гипертонический шок эритроцитов человека изучен достаточно [2, 3, 6], поэтому представляло интерес исследовать его особенности для эритроцитов других млекопитающих, которые могут отличаться размерами, деформируемостью мембраны, доминирующими внутриклеточными катионами и активностью транспортных путей [7, 10, 12, 15].

Для исследования были выбраны эритроциты быка, которые характеризуются высоким значением отношения площадь поверхности/объем [7]. Эритроцитарные мембраны быка содержат много сфингомиелина при практически полном отсутствии фосфатидилхолина [11], а в цитоплазме этих клеток как доминирующий катион присутствуют ионы натрия [10].

Цель работы – исследовать чувствительность предварительно обезвоженных эритроцитов человека и быка к 4,0 М NaCl, оценить изменение гематокрита на этапе, предшествующем гипертоническому стрессу клеток.

### Материалы и методы

Эритроциты получали из крови человека и быка, заготовленной на глюцицировом консерванте. После удаления плазмы эритроциты дважды отмывали путем центрифугирования при 1500 g в течение 3 мин в 10-кратном объеме физиологического раствора (0,15 М NaCl, 0,01 М фосфатный буфер, pH 7,4) и хранили в виде плотного осадка не более двух часов при температуре 0°C. Все используемые в работе среды готовили на 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,4.

Концентрацию растворов контролировали изменением осмолярности на осмометре ОМКА 1Ц-01 (Украина).

Клетки инкубировали в умеренно гипертонических растворах NaCl (гематокрит 8 %) в течение 2 мин, после чего их подвергали гипертоническому стрессу перенесением в раствор, содержащий 4,0 М NaCl (гематокрит 0,4 %), на 5 мин при температуре 37 или 0°C. Количество гемоглобина в супернатанте определяли спектрофотометрически ( $\lambda=543$  нм) и выражали в процентах по отношению к 100%-му гемолизу эритроцитов в присутствии детергента тритона X-100 (0,1%).

Изменения объема эритроцитов в средах предварительной инкубации контролировали микрогематокритным методом (микроцентрифуга МГЦ-8).

В работе использовали реактивы отечественного производства квалификации “х.ч.” и “ч.д.а.”.

Исследовали эритроциты крови 6 доноров в 2-х параллельных пробах. Результаты анализировали с помощью критерия Mann-Whitney и ANOVA.

which may differ by sizes, membrane deformability, dominating intracellular cations and transport way activity [7, 10, 12, 15].

Bovine erythrocytes, characterising by high value of surface area/volume ratio have been selected for the research [7]. Bovine erythrocyte membranes contain a high amount of sphingomyelin at quite a complete phosphatidylcholine absence [11], but sodium ions are present in these cells cytoplasm as dominating cation [10].

Research was targeted to investigate the sensitivity of preliminarily dehydrated human and bovine erythrocytes to 4.0 M NaCl and to estimate the hematocrit change at the stage, preceding cell hypertonic stress.

### Materials and methods

Erythrocytes were derived from human and bovine blood, procured with glycicir preservative. After plasm removal the erythromass was twice washed out by centrifugation at 1500 g for 3 min in a 10-fold volume of physiological solution (0.15 M NaCl, 0.01 M phosphate buffer, pH 7.4) and stored as a dense sediment for less than 2 hours at 0°C. All the media used in the work were prepared with 0.01 M phosphate buffer, pH 7.4.

Solution concentration was controlled by measuring osmolarity with ОМКА 1С-01 osmometer (Ukraine).

Cells were incubated in moderately hypertonic NaCl solutions (8% hematocrit) for 2 min then subjected to hypertonic stress by transferring them into the 4.0 M NaCl-containing solution (0.4% hematocrit) for 5 min at 37 or 0°C. Hemoglobin number in supernatant was spectrophotometrically determined ( $\lambda=543$  nm) and expressed in percentage in respect of 100% erythrocyte hemolysis in triton X-100 detergent presence (0.1%).

Changes in erythrocyte volume in the media of preliminary incubation were controlled by microhematocrit method (MGC-8 microcentrifuge).

Nationally produced reagents with “chemically pure” and “pure for analysis” grades were used in the research.

Blood erythrocytes of 6 donors in 2 parallel samples have been studied. Results were processed with Mann-Whitney and ANOVA tests.

### Results and discussion

The Fig. 1 shows the dependencies of hypertonic hemolysis of human and bovine erythrocytes in 4.0 M NaCl-containing solution on salt concentration in preliminary incubation medium. Erythrocytes were first incubated in the media with moderate tonicity either at 37 or 0°C, then transferred into 4.0 M NaCl under unchanged temperature. At 37°C the cells, transferred into 4.0 M NaCl from isotonic (0.15 M NaCl) conditions

## Результаты и обсуждение

На рис.1 представлены зависимости гипертонического гемолиза эритроцитов человека и быка в растворе, содержащем 4,0 М NaCl, от концентрации соли в среде предварительной инкубации. Сначала эритроциты инкубировали в средах умеренной тоничности при 37 или 0°C, а затем переносили в 4,0 М NaCl без изменения температуры. При 37°C клетки, перенесенные в 4,0 М NaCl из изотонических (0,15 М NaCl) условий, характеризуются высокой чувствительностью к гипертоническому шоку: гемолиз эритроцитов человека составляет 85%, клеток быка – примерно 70%. В аналогичных условиях, но при 0°C значения гипертонического гемолиза эритроцитов человека и быка ниже, чем при 37°C. Следует отметить, что для эритроцитов быка снижение температуры инкубирования до 0°C сопровождается уменьшением гемолиза в 3,5 раза, для клеток человека – в 1,3 раза. Таким образом, клетки быка, характеризующиеся меньшими размерами по сравнению с эритроцитами человека [7], более устойчивы к гипертоническому стрессу, что согласуется с данными, представленными в [8].

Зависимости гипертонического гемолиза эритроцитов человека в 4,0 М NaCl от концентрации соли в среде предварительной инкубации при двух температурных режимах имеют перевернутую куполообразную форму (рис.1,а). По мере увеличения концентрации соли в средах наблюдается снижение уровня гипертонического гемолиза эритроцитов человека до минимального значения с последующим его повышением. Полученные зависимости гипертонического гемолиза эритроцитов человека в 4,0 М NaCl при 37 и 0°C практически идентичны, но смещены относительно друг друга. При этом отмечается минимальное значение гипертонического гемолиза эритроцитов человека, которые предварительно находились в среде, содержащей 0,4 М NaCl. Следует отметить, что при температуре 0°C удастся достигнуть меньшего гемолитического повреждения эритроцитов человека, чем при 37°C, что хорошо согласуется с данными [6].

Минимальное значение гипертонического гемолиза эритроцитов быка в 4,0 М NaCl при 37°C регистрируется после предварительного инкубирования клеток в среде, содержащей 1,0 М NaCl (рис.1,б). Таким образом, для достижения осмотически устойчивого состояния эритроцитов быка необходима концентрация NaCl на этапе предварительной инкубации почти в 2 раза выше, чем для клеток человека. Характерной особенностью зависимости гипертонического гемолиза эритроцитов быка от концентрации соли в среде предварительной инкубации является отсутствие хорошо

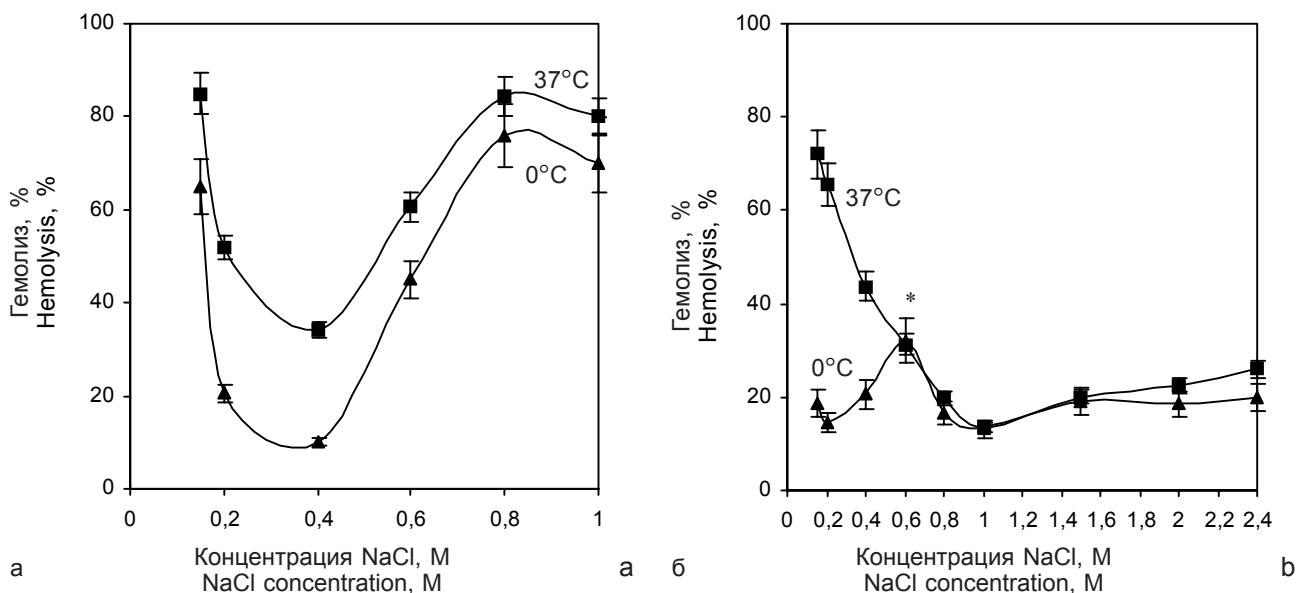
are characterised by a high sensitivity to hypertonic stress: human erythrocyte hemolysis is 85% and nearly 70% for bovine cells. Under similar conditions but at 0°C the values of hypertonic hemolysis for human and bovine erythrocytes are lower, than at 37°C. Of note is that for bovine and human erythrocytes a decrease in incubation temperature down to 0°C is accompanied with hemolysis decrease in 3.5 and 1.3 times, correspondingly. Thus, the bovine cells, characterising with less sizes than human erythrocytes [7] are more resistant to hypertonic stress, that corresponds to the data presented in the paper [8].

Dependencies of hypertonic hemolysis of human erythrocytes in 4.0 М NaCl on salt concentration in the medium of preliminary incubation under two temperature regimens are reversed and dome-shaped (Fig. 1, a). With an increase in salt concentration in the media there is observed a decreased level of human erythrocyte hypertonic hemolysis down to the minimum value with its following increase. The obtained curves of hypertonic hemolysis dependency of human erythrocytes in 4.0 М NaCl at 37 and 0°C are almost identical, but shifted in respect to each other. At the same time the minimum value of hypertonic hemolysis for human erythrocytes, preliminarily exposed in the 0.4 М NaCl-containing medium is noted. Of note is the fact, that at 0°C we manage to obtain the less hemolytic damage in human erythrocytes than at 37°C, that corresponds well with the data [6].

The minimum value of bovine erythrocyte hypertonic hemolysis in 4.0 М NaCl at 37°C is registered after preliminary cell incubation in 1.0 М NaCl-containing medium (Fig. 1, b). Thus, almost twice higher NaCl concentration, than for human cells, is necessary for approaching to an osmotically resistant state of bovine erythrocytes at the stage of preliminary incubation. A characteristic feature of the dependency curve for bovine erythrocyte hypertonic hemolysis on salt concentration in preliminary incubation medium is the absence of strongly manifested right curve branch. Further increase in salt concentration in preliminary incubation medium (>2.4 М NaCl) was inexpedient due to hemolytic process development in erythrocytes [4].

Temperature decrease in the media down to 0°C results in a significant form modification of dependency curve for bovine erythrocyte hypertonic hemolysis on salt concentration in preliminary incubation medium (Fig. 1, b), with its increase up to 0.6 М NaCl a slight but statistically significant augmentation in hypertonic hemolysis level with its following decrease even to the control value and curve approaching to the plateau are observed.

The fact, that at 37 and 0°C the forms of dependency curves for human erythrocyte hypertonic hemolysis on salt concentrations in preliminary incubation medium are quite similar, but under low temperature



**Рис. 1.** Зависимость гипертонического гемолиза эритроцитов человека (а) и быка (б) в 4,0 М NaCl от концентрации NaCl в средах предварительной инкубации при температуре 37 и 0°C. \* – различия достоверны по отношению к контролю;  $P < 0,05$ .

**Fig. 1.** Dependency of hypertonic hemolysis of human (a) and bovine (b) erythrocytes in 4.0 M NaCl on NaCl concentration in preliminary incubation media at 37 and 0°C. \* – differences are statistically significant in respect to the control;  $P < 0.05$ .

выраженной правой ветви кривой. Дальнейшее повышение концентрации соли в средах предварительной инкубации ( $> 2,4$  М NaCl) было нецелесообразным из-за развития гемолитического процесса в эритроцитах [4].

Тот факт, что при 37 и 0°C формы зависимостей гипертонического гемолиза эритроцитов человека от концентрации соли в среде предварительной инкубации весьма схожи, но при низкой температуре кривая смещена в сторону меньших значений гемолиза, свидетельствуют, что в клетках происходят процессы, выраженность которых определяется температурой. Для эритроцитов быка ярко выраженные различия в формах кривых зависимости гипертонического гемолиза при 37 и 0°C позволяют допустить наличие еще и дополнительных качественно иных процессов в клетках, происходящих при низкой температуре.

Что является причиной формирования осмотически устойчивого состояния клеток разных видов млекопитающих и почему для этого необходимы различные условия? Допуская, что различия обусловлены и видовыми особенностями состава эритроцитарных мембран [11, 13, 17], полагаем, что к формированию устойчивого состояния клеток имеет отношение, в первую очередь, снижение содержания осмотически активной внутриклеточной фракции воды. Для оценки изменения объема клеток было проведено измерение гематокрита клеточной суспензии в средах, содержащих различные концентрации NaCl.

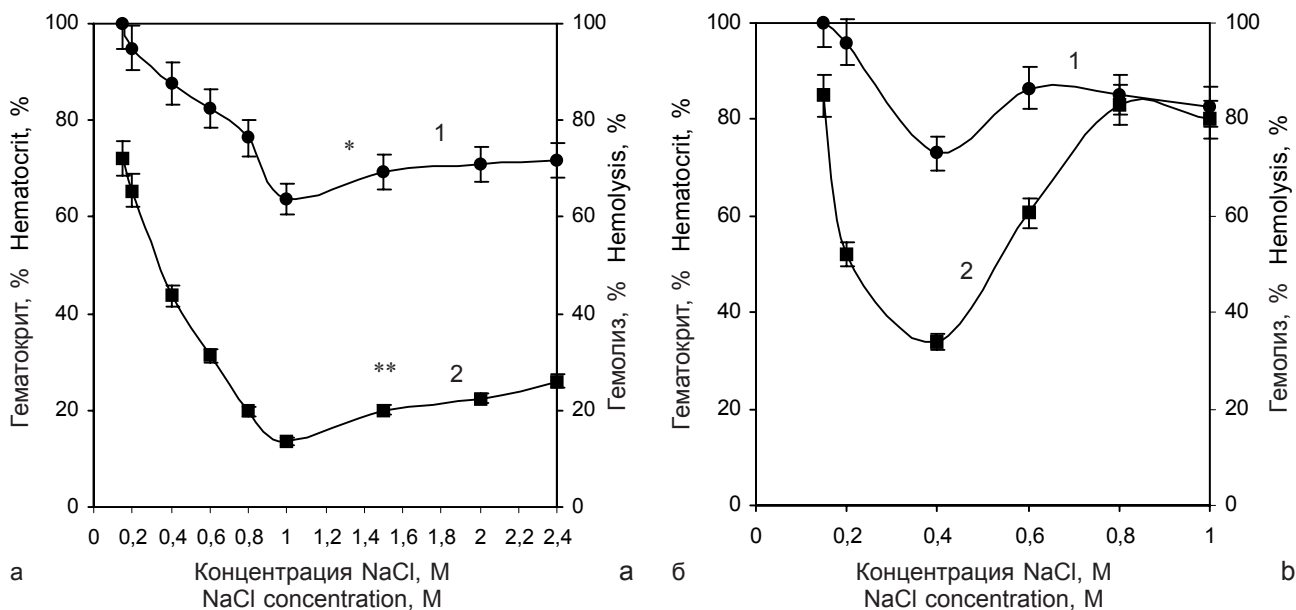
На рис. 2 представлены результаты изменения гематокрита эритроцитов быка и человека в средах

the curve is shifted towards lower hemolysis values, testifies to occurrence of some processes in cells, having temperature-determined manifestation rate. For bovine erythrocytes the strongly manifested differences in the form of dependency curves of hypertonic cryohemolysis at 37 and 0°C enable assuming the presence of even more additional different in quality processes in cells, occurring under low temperature.

What is the reason for osmotically resistant cell state formation in different mammalian species and why different conditions are necessary for this? If assuming the differences as also stipulated by specific peculiarities of erythrocyte membrane composition [11, 13, 17], a decrease in the content of osmotically active intracellular water fraction is primarily believed to concern a resistant cell state formation. Cell suspension hematocrit in the media, containing differently concentrated NaCl, was measured for estimating the cell volume changes.

The Fig. 2 demonstrates the results of hematocrit changes in bovine and human erythrocytes in the media with differently concentrated NaCl (curve 1) and the hemolysis values after these cells transfer into 4.0 M NaCl (curve 2) at 37°C are compared. The Fig. 2 shows that with an increase in salt concentration in the medium there is a decrease in bovine erythrocyte volume with approaching to the minimum values (1.0 M NaCl), afterwards its slight increase is observed. A decrease in hematocrit level of bovine erythrocytes with following augmentation in preliminary incubation media (curve 1) correlates well with a change in erythrocyte hypertonic hemolysis in 4.0 M NaCl (curve 2). Bovine cells, approaching to the minimum volume





**Рис. 2.** Изменение гематокрита эритроцитов быка (а) и человека (б) в средах с различной концентрацией NaCl (1) и величины гемолиза клеток при последующем перенесении в 4,0 М NaCl (2) при температуре 37°C. \* – различия достоверны по отношению к значениям гематокрита, полученным после инкубации в 1,0 М NaCl; P < 0,05; \*\* – различия достоверны по отношению к значениям гемолиза в 4,0 М NaCl после прединкубации в 1,0 М NaCl; P < 0,05.

**Fig. 2.** Change in hematocrit of bovine (a) and human (b) erythrocytes with differently concentrated NaCl (1) and cell hemolysis value during following transfer into 4.0 M NaCl (2) at 37°C. \* – differences are statistically significant in respect to the hematocrit values, obtained after incubation in 1.0 M NaCl; P < 0.05; \*\* – differences are statistically significant in respect to hemolysis values in 4.0 M NaCl after preliminary incubation in 1.0 M NaCl; P < 0.05.

с различной концентрацией NaCl (кривая 1) и для сравнения приведены величины гемолиза после перенесения этих клеток в 4,0 М NaCl (кривая 2) при температуре 37°C. Как видно из рис.2, а, по мере увеличения концентрации соли в среде объем эритроцитов быка уменьшается и достигает минимальных значений (1,0 М NaCl), после чего наблюдается небольшое его повышение. Снижение уровня гематокрита эритроцитов быка с последующим повышением в средах предварительной инкубации (кривая 1) хорошо коррелирует с изменением гипертонического гемолиза эритроцитов в 4,0 М NaCl (кривая 2). Клетки быка, достигающие минимального объема в среде, содержащей 1,0 М NaCl, проявляют максимальную устойчивость при перенесении в 4,0 М NaCl.

Для эритроцитов человека (рис.2, б) также наблюдается подобная корреляция между объемной характеристикой клеток на этапе прединкубации (кривая 1) и их гипертоническим гемолизом в 4,0 М NaCl (кривая 2). Эритроциты человека максимально сжимаются в среде, содержащей 0,4 М NaCl, и проявляют максимальную устойчивость при последующем перенесении в 4,0 М NaCl из указанной среды прединкубации.

При 37°C уровень минимального гипертонического гемолиза эритроцитов быка намного ниже, чем для эритроцитов человека. Кроме того, подобное соотношение наблюдается и между значениями минимального гематокрита указанных клеток. Если при 37°C минимальный гематокрит

in the 1.0 М NaCl-containing medium manifest the maximum resistance during transfer into 4.0 М NaCl.

For human erythrocytes (Fig. 2, b) the similar correlation between the volume characteristics of cells at the stage of preliminary incubation (curve 1) and their hypertonic hemolysis in 4.0 М NaCl (curve 2) is also noted. Human erythrocytes are maximally shrunk in the 0.4 М NaCl-containing medium and manifest the maximum resistance at following transfer into 4.0 М NaCl.

At 37°C the level of maximum hypertonic hemolysis for bovine erythrocytes was much lower than for human ones. In addition, a similar ratio is also observed between the minimum hematocrit values of the mentioned cells. If at 37°C the minimum hematocrit of human erythrocytes is 70%, this is 60% for bovine ones. Since at 0°C the level of minimum hypertonic hemolysis of human erythrocytes is much lower than at 37°C, it was expedient to investigate a change in cell volume in the media with different NaCl concentration at 0°C. Temperature decrease in solutions down to 0°C (Fig. 3) results in more manifested reduction in human erythrocyte volume (down to 50%), comparable with volume change in bovine cells at 37°C (down to 60%) with thereby observed quite similar levels of minimum erythrocyte hemolysis in both species (10-15%).

Thus, a comparable change in erythrocyte volume at the stage of preliminary incubation in the media of moderate hypertony is suggested as resulting in quite equal hemolysis values of these cells in 4.0 М NaCl.

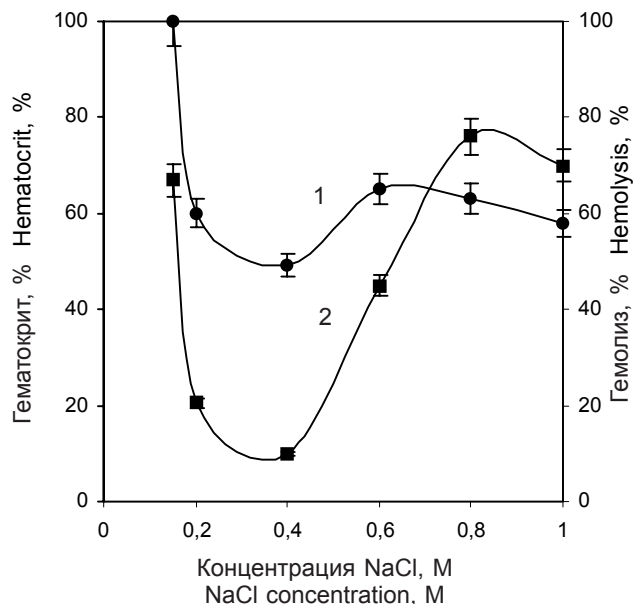
эритроцитов человека составляет 70%, то эритроцитов быка – 60%. Так как при 0°C уровень минимального гипертонического гемолиза эритроцитов человека гораздо ниже, чем при 37°C, целесообразно было исследовать изменение клеточного объема в средах с различной концентрацией NaCl при 0°C. Снижение температуры растворов до 0°C (рис. 3) приводит к более выраженному уменьшению объема эритроцитов человека (до 50%), соизмеримому с изменением объема клеток быка при 37°C (до 60%), при этом наблюдаются практически одинаковые уровни минимального гемолиза эритроцитов обоих видов (10-15%).

Таким образом, можно полагать, что соизмеримое изменение объема эритроцитов на этапе предварительной инкубации в средах умеренной гипертонии будет приводить к примерно одинаковым величинам гемолиза этих клеток в 4,0 М NaCl.

Bogner и соавт. [9] проводили сравнительное изучение внутриклеточного состава эритроцитов разных видов млекопитающих, оценивая внутриклеточное содержание воды, катионов, их соотношение, и определяли гидрофильность молекул гемоглобина. Было показано, что по содержанию внутриклеточной воды эритроциты млекопитающих незначительно отличаются друг от друга. Содержание воды в эритроцитах человека несколько выше, чем в клетках быка, кроме того, доля структурированной воды выше в эритроцитах быка [9]. Остается неясным, почему осмотически устойчивое состояние эритроцитов человека формируется в 0,4 М NaCl, а клеток быка – в 1,0 М NaCl, почему процесс обезвоживания эритроцитов человека при 0°C проявляется в большей степени, чем при 37°C. Можно допустить, что формирование осмотически устойчивого состояния клеток определяется не только содержанием внутриклеточной воды, но и особенностями плазматических мембран эритроцитов человека и быка [11, 17]. Большая устойчивость эритроцитов быка к гиперосмотическому воздействию может быть обусловлена большим содержанием в их мембранах холестерина и сфингомиелина [11, 17], в результате чего образование участков, в которых формируются дефекты утечки внутриклеточного содержимого, будет затруднено [14, 16].

### Выводы

Предварительная инкубация эритроцитов человека в 0,4 М NaCl и быка в 1,0 М NaCl приводит к формированию устойчивого состояния клеток к последующему действию 4,0 М NaCl. Показано, что максимальное сжатие эритроцитов на этапе предварительной инкубации в средах умеренной гипертонии коррелирует с минимальным уровнем



**Рис. 3.** Изменение гематокрита эритроцитов человека в средах с различной концентрацией NaCl (1) и величины гемолиза клеток при последующем перенесении в 4,0 М NaCl (2) при температуре 0°C.

**Fig. 3.** Change in hematocrit of human erythrocytes with differently concentrated NaCl (1) and cell hemolysis value during following transfer into 4.0 M NaCl (2) at 0°C.

Bogner and co-authors [9] compared an intracellular erythrocyte composition of different mammalian species by estimating an intracellular content of water, cations, their ratios, and determined hydrophilicity of hemoglobin molecules. By the content of intracellular water the mammalian erythrocytes were shown as slightly different from each other. Water content in human erythrocytes is slightly higher than in bovine cells, in addition a part of structured water is higher in bovine erythrocytes [9]. It remains unclear why an osmotically resistant state of human and bovine erythrocytes is formed in 0.4 and 1.0 M NaCl, correspondingly, why the process of human erythrocytes dehydration at 0°C is more manifested than at 37°C. Not only the content of intracellular water, but peculiarities of plasma membranes of human and bovine erythrocytes may be assumed as being responsible for the formation of osmotically resistant cell state [11, 17]. High resistance of bovine erythrocytes to hyperosmotic effect may be stipulated with a high cholesterol and sphingomyelin content in their membranes [11, 17], resulting in a complicated formation of the sites, where the defects of intracellular content leakage are formed [14, 16].

### Conclusions

Preliminary incubation of human and bovine erythrocytes in 0.4 and 1.0 M NaCl, correspondingly, results in the resistant cell state formation to the following 4.0 M NaCl effect. Maximum erythrocyte shrinking at the stage of preliminary incubation in

гемолиза при перенесении клеток в среду, содержащую 4,0 М NaCl.

## Литература

1. *Бабийчук Л.А., Землянских Л.Г.* Оптимизация и преимущество безотмывочного метода криоконсервирования эритроцитов с ПЭО-1500 // Пробл. криобиологии.– 2001.– №1.– С. 35-41.
2. *Белоус А.М., Грищенко В.И.* Криобиология.– Киев: Наук. думка, 1994.– 432 с.
3. *Белоус А.М., Гордиенко Е.А., Розанов Л.Ф.* Замораживание и криопротекция.– М.: Высш. школа, 1987.– 80 с.
4. *Ершов С.С., Орлова Н.В., Шпакова Н.М.* Чувствительность эритроцитов млекопитающих к изменению температурных и осмотических условий среды // Пробл. криобиологии.– 2004.– №3.– С. 51-57.
5. *Мельникова О.В., Бондаренко Т.П.* Модифицирующее действие глюкозы на эритроциты в условиях охлаждения и замораживания: Сб. науч. трудов "Физико-химические процессы в криобиологических системах".– Харьков, 1991.– С. 68-78.
6. *Поздняков В.В., Бондаренко В.А.* Взаимосвязь между исходными осмотическими условиями среды и чувствительностью эритроцитов к гипертоническому стрессу в 4,0 М NaCl // Криобиология.– 1989.– №1.– С. 47-49.
7. *Шмидт-Ниельсен К.* Размеры животных: почему они так важны?– М.: Мир, 1987.– 260 с.
8. *Betticher D. C., Geiser J.* Resistance of mammalian red blood cells of different size to hypertonic milieu // Comp. Biochem. Physiol. A.– 1989.– Vol. 93, N2.– P. 429-432.
9. *Bogner P., Csutora P., Cameron I. L et al.* Augmented water binding and low cellular water content in erythrocytes of camel and camelids // Biophys. J.– 1998.– Vol. 75, N6.– P. 3085-3091.
10. *Bogner P., Sipos K., Ludany A. et al.* Steady-state volumes and metabolism-independent osmotic adaptation in mammalian erythrocytes // Eur. Biophys. J.– 2002.– Vol. 31, N2.– P. 145-152.
11. *Florin-Christensen J., Suarez C.E., Florin-Christensen M. et al.* A unique phospholipids organization in bovine erythrocyte membranes // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2001.– Vol. 98, N14.– P. 7736-7741.
12. *Garnier M., De Preville G., Pilardeau T.P., Boudia D.* Relationship between the intra-erythrocyte sodium composition and the membrane lipoprotein composition among different mammal species // Comp. Biochem. Physiol. – 1984.– Vol. 77A, N2.– P. 315-317.
13. *Matei H., Frentescu L., Benga Gh.* Comparative studies of the protein composition of red blood cell membranes from eight mammalian species // J.Cell.Mol.Med.– 2000.– Vol. 4, N4.– P. 270-276.
14. *Parrinello N., Cammarata M., Lipari L., Arizza V.* Sphingomyelin inhibition of *Ciona intestinalis* (Tunicata) cytotoxic hemocytes assayed against sheep erythrocytes // Dev. Comp. Immunol.– 1995.– Vol. 19, N1.– P. 31-41.
15. *Plasenzotti R., Stoiber B., Posch M., Windberger U.* Red blood cell deformability and aggregation behaviour in different animal species // Clin. Hemorheol. Microcirc.– 2004.– Vol. 31, N2.– P. 105-111.
16. *Shinozawa S., Araki Y., Utsumi K., Oda T.* Stabilizing effects of cholesterol on changes in membrane permeability and potential induced in red blood cells by lysolecithin // Physiol. Chem. Phys.– 1979.– Vol. 11, N1.– P. 161-167.

moderately hypertonic media was shown to correlate with the minimum hemolysis level when transferring cells into the 4.0 M NaCl-containing medium.

## References

1. *Babijchuk L.A., Zemlyanskikh N.G.* Optimizing and advantage of free washing out method for erythrocyte cryopreservation with PEO-1500 //Problems of Cryobiology.– 2001.– N1.– P. 35-41.
2. *Belous A.M., Grischenko V.I.* Cryobiology.– Kiev: Nauk. dumka, 1994.– 432p.
3. *Belous A.M., Gordienko E.A., Rozanov L.F.* Freezing and cryoprotection.– Moscow: Vysshaya shkola, 1987.– 80 p.
4. *Ershov S.S., Orlova N.V., Shpakova N.M.* Sensitivity of mammalian erythrocytes to changes in medium temperature and osmotic conditions // Problems of Cryobiology.– 2004.– N3.– P. 51-57.
5. *Mel'nikova O.V., Bondarenko T.P.* Modifying effect of glucose on erythrocytes under cooling and freezing // Coll. of scientific papers "Physical and chemical processes in cryobiological systems".– Kharkov, 1991.– P. 68-78.
6. *Pozdnyakov V.V., Bondarenko T.P.* Relationship between initial osmotic conditions of medium and erythrocyte sensitivity to hypertonic stress in 4.0 M NaCl // Kriobiologiya.– 1989.– N1.–P.47-49.
7. *Shmidt-Nielson K.* Animal sizes: why they are so important?– Moscow: Mir, 1987.– 260 p.
8. *Betticher D. C., Geiser J.* Resistance of mammalian red blood cells of different size to hypertonic milieu // Comp. Biochem. Physiol. A.– 1989.– Vol. 93, N2.– P. 429-432.
9. *Betticher D. C., Geiser J.* Resistance of mammalian red blood cells of different size to hypertonic milieu // Comp. Biochem. Physiol. A.– 1989.– Vol. 93, N2.– P. 429-432.
10. *Bogner P., Sipos K., Ludany A. et al.* Steady-state volumes and metabolism-independent osmotic adaptation in mammalian erythrocytes // Eur. Biophys. J.– 2002.– Vol. 31, N2.– P. 145-152.
11. *Florin-Christensen J., Suarez C.E., Florin-Christensen M. et al.* A unique phospholipids organization in bovine erythrocyte membranes // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2001.– Vol. 98, N14.– P. 7736-7741.
12. *Garnier M., De Preville G., Pilardeau T.P., Boudia D.* Relationship between the intra-erythrocyte sodium composition and the membrane lipoprotein composition among different mammal species // Comp. Biochem. Physiol. – 1984.– Vol. 77A, N2.– P. 315-317.
13. *Matei H., Frentescu L., Benga Gh.* Comparative studies of the protein composition of red blood cell membranes from eight mammalian species // J.Cell.Mol.Med.– 2000.– Vol. 4, N4.– P. 270-276.
14. *Parrinello N., Cammarata M., Lipari L., Arizza V.* Sphingomyelin inhibition of *Ciona intestinalis* (Tunicata) cytotoxic hemocytes assayed against sheep erythrocytes // Dev. Comp. Immunol.– 1995.– Vol. 19, N1.– P. 31-41.
15. *Plasenzotti R., Stoiber B., Posch M., Windberger U.* Red blood cell deformability and aggregation behaviour in different animal species // Clin. Hemorheol. Microcirc.– 2004.– Vol. 31, N2.– P. 105-111.
16. *Shinozawa S., Araki Y., Utsumi K., Oda T.* Stabilizing effects of cholesterol on changes in membrane permeability and potential induced in red blood cells by lysolecithin // Physiol. Chem. Phys.– 1979.– Vol. 11, N1.– P. 161-167.

17. *Wessels J.M., Veerkamp J.H.* Some aspects of the osmotic lysis of erythrocytes III. Comparison of glycerol permeability and lipid composition of red blood cell membranes from eight mammalian species // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1973.— Vol. 291, N1.— P. 190-196.

*Поступила 25.07.2007*

17. *Wessels J.M., Veerkamp J.H.* Some aspects of the osmotic lysis of erythrocytes III. Comparison of glycerol permeability and lipid composition of red blood cell membranes from eight mammalian species // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1973.— Vol. 291, N1.— P. 190-196.

*Accepted in 25.07.2007*