

Постгипертонический лизис эритроцитов при изменении pH и состава регидратирующей среды

О.А. ОЛЕЙНИК, В.В. РАМАЗАНОВ, В.А. БОНДАРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Posthypertonic Lysis of Red Blood Cells when Changing pH and Composition of Rehydrating Medium

OLEJNIK O.A., 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 состава сред регидратации на чувствительность клеток к постгипертоническому лизису. Показано, что гипертонические регидратирующие среды предотвращают повреждения эритроцитов. Разведение этих сред приводит к увеличению уровня гемолиза. Применение криопротектора ПЭГ-1500 позволяет увеличить сохранность клеток.

Досліджували вплив складу середовищ регідрації на чутливість клітин до постгіпертонічного лізису. Показано, що гіпертонічні середовища регідрації запобігають ушкодженню еритроцитів. Розведення цих середовищ призводить до збільшення рівня гемолізу. При цьому застосування криопротектора ПЕГ-1500 дозволяє підвищити цілість клітин.

We have investigated the effect of rehydration medium composition on cells' sensitivity to posthypertonic lysis. It has been shown that hypertonic rehydration media prevent red cell damages. Dilution of these media results in an increase of the hemolysis level. Application of PEG-1500 cryoprotectant allows to increase the cell integrity.

Криоконсервирование клеточных суспензий - одна из основных задач криобиологии, поэтому необходимо разработать методы, предотвращающие повреждение клеток на этапах замораживания-оттаивания, и изучить повреждающее действие факторов замораживания. Перенос клеток из изотонических условий в гипертонические и наоборот позволяет получить модели замораживания и оттаивания без применения низких температур.

Постгипертонический лизис – это повреждение эритроцитов, возникающее при переносе их из гипертонических условий в изотонические, развивающийся как в солевой, так и в неэлектролитной средах. Повреждения клеток происходят при увеличении клеточного объема на этапе регидратации вследствие поступления в клетку воды. Варьировать чувствительность эритроцитов к постгипертоническому лизису позволяет состав среды регидратации [2, 4]. Цель работы - изучение влияния регидратирующих сред на чувствительность клеток к постгипертоническому лизису.

Эритроциты получали из донорской крови группы II. После удаления плазмы клетки трижды отмывали физиологическим раствором (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л трис-буфера, pH 7,4) и хранили не более 3-х часов при 0°C. Среды для предварительной инкубации (0,15 моль/л NaCl, 0,45 моль/л NaCl, 0,15 моль/л NaCl +0,4 моль/л сахарозы, 0,15 моль/л NaCl+15 % ПЭГ-1500) и гипертонические среды (3 моль/л NaCl, 3 моль/л NaCl + 0,4 моль/л сахарозы, 3 моль/л NaCl +15% ПЭГ-1500) буфера не содержали, для регидратирующих сред в качестве буфера использовали

Cryopreservation of cell suspensions is one of the main tasks of cryobiology, therefore it is of necessity to elaborate the methods, preventing cell damage at the stages of freeze-thawing and study the damaging effect of freezing factors. Cell transfer out of isotonic conditions into hypertonic ones and vice versa, allows to obtain a freeze-thawing model without low temperatures application. Posthypertonic lysis, developed both in saline and non-electrolyte media, is a red cell damage appeared when transferring them out of hypertonic conditions into isotonic ones. Cell damages occur when increasing cellular volume at the stage of rehydration due to water entering into a cell. We can vary the red cells' susceptibility to posthypertonic lysis by means of the composition of rehydration medium [2, 4]. The aim of this work was to study the effect of rehydrating media on cell susceptibility to posthypertonic lysis.

Red blood cells were obtained from donors' blood (the 2nd group). After a plasma removal the cells were thrice washed-out by physiological solution (0.15 mol/l, 0.01 mol/l tris-buffer, pH7.4) and stored not more than 3 hrs under the temperature of 0°C. The media for preliminary incubation (0.15 mol/l NaCl +0.4mol/l sucrose; 0.15 mol/l NaCl +15% PEG-1500) and hypertonic media (3 mol/l NaCl, 3 mol/l NaCl+0,4 mol/l sucrose, 3 mol/l NaCl +15% PEG-1500) did not contain the buffer, for rehydrating media as a buffer we have used maleinic acid (pH 5.8; 6.6) and tris-buffer (pH 7.4).

When carrying-out the experiments on posthypertonic lysis by means of Gilson's piston pipette we have transferred 70µl of red cells' sediment (70% hematocrite) into 30 µl of preincubation medium

малеиновую кислоту (pH 5,8; 6,6) и трис-буфер (pH 7,4).

При выполнении экспериментов по постгипертоническому лизису поршневым дозатором Gilson 70 мкл осадка эритроцитов (с гематокритом 70 %) переносили в 30 мкл среды предынкубации (0,15 моль/л NaCl, 0,45 моль/л NaCl, 0,15 моль/л NaCl + 0,4 моль/л сахарозы, 0,15 моль/л NaCl + 15% ПЭГ-1500) на 1 мин. После этого отбирали аликвоты клеточной суспензии по 10 мкл и переносили на 10 с в гипертонические среды (3 моль/л NaCl, 3 моль/л NaCl + 0,4 моль/л сахарозы, 3 моль/л NaCl + 15% ПЭГ-1500), затем добавляли регидратирующие среды объёмом 1 мл с различными значениями pH (5,8; 6,6; 7,4), инкубировали 5 мин, центрифугировали 3 мин и спектрофотометрическим методом измеряли уровень гемолиза в надосадке. В ряде экспериментов регидратирующие среды после 5-минутной инкубации разводили физиологическим раствором с соответствующим pH в 10-кратном объеме и инкубировали ещё 10 мин с последующим центрифугированием. Далее супернатант удаляли, а к осадку добавляли 1 мл 0,04 %-го тритона X-100 и измеряли уровень гемолиза в пробах. Все эксперименты проводили при комнатной температуре (22°C). Использовали ингибиторы анионного транспорта ДИДС в концентрации 5 мкМ и дипиридамола в концентрации 20 мкМ.

На рис. 1 показана зависимость уровня постгипертонического лизиса от состава регидратирующей среды. Видно, что значительный гемолиз (около 80%) имеет место при переносе контрольных клеток из гипертонической среды в изотоническую, содержащую 150 мМ NaCl при 3-х значениях pH (рис. 1, кривая 1). Различий в уровне гемолиза при указанных pH не наблюдалось. Клетки, предварительно проинкубированные в среде с 0,45 моль/л NaCl, затем помещённые в гипертонический раствор NaCl и обратно перенесённые в 0,45 моль/л NaCl, гемолизуют намного меньше по сравнению с контролем (рис. 1, кривая 2). Различий между уровнем гемолиза эритроцитов в средах с различными значениями pH не наблюдается. Эритроциты, проинкубированные в среде, содержащей 0,15 моль/л NaCl и 0,4 моль/л сахарозы и затем помещённые в гипертонический раствор с последующим обратным переносом в среду с 0,15 моль/л NaCl и 0,4 моль/л сахарозы, характеризуются низким уровнем гемолиза и отсутствием pH зависимости (рис. 1, кривая 3). Эритроциты, экспонированные в среде, включающей 0,15 моль/л NaCl + 15% ПЭГ-1500, в гипертоническом растворе NaCl и затем снова перенесённые в 0,15 моль/л NaCl + 15% ПЭГ-1500, ведут себя аналогично (рис. 1, кривая 4).

Использование регидратирующей среды состава 0,135 моль/л NaCl + 0,03 моль/л сахарозы привело к повышению уровня гемолиза (рис. 2)

(0.15 mol/l NaCl; 0.45 mol/l NaCl; 0.15 mol/l NaCl + 0.4 mol/l sucrose; 0.15 mol/l NaCl + 15% PEG-1500) for 1 min. Then the aliquots of cellular suspension were taken by 10µl and transferred into hypertonic media for 10s (3 mol/l NaCl, 3 mol/l NaCl + 0.4mol/l sucrose, 3 mol/l NaCl + 15% PEG-1500), then 1 ml of rehydrating media with different pH values (5,8; 6,6; 7,4) was added, incubated during 5 min, centrifuged during 3 min and the hemolysis level in a supernatant was measured by means of spectrophotometry method. In the series of experiments rehydrating media after 5min' incubation were 10 times diluted by physiological solution with corresponding pH and then incubated during 10 min with the further centrifuging. Then the supernatant was removed, 1ml 0.04% triton X-100 was added to the sediment and hemolysis level in the samples was measured. All the experiments were done under room temperature (22°C). We have used the inhibitor of anionic transport (DIDS) in the concentration of 5µM and dipyrindamole in the concentration of 20µM.

In Fig. 1 the dependence of the level of posthypertonic lysis on the composition of rehydrating medium is demonstrated. It is seen that a considerable hemolysis (about 80%) occurs when transferring the control cells out of hypertonic medium into isotonic one, comprising 150 mM NaCl at three pH values (Fig. 1, curve 1). No differences in hemolysis level at the mentioned pH were observed. Cells, preliminarily incubated in the medium with 0.45 M/l NaCl, then immersed into NaCl hypertonic solution and transferred again into 0.45 mol/l NaCl, are hemolysed much less comparing to the control (Fig. 1, curve 2). No differences between the

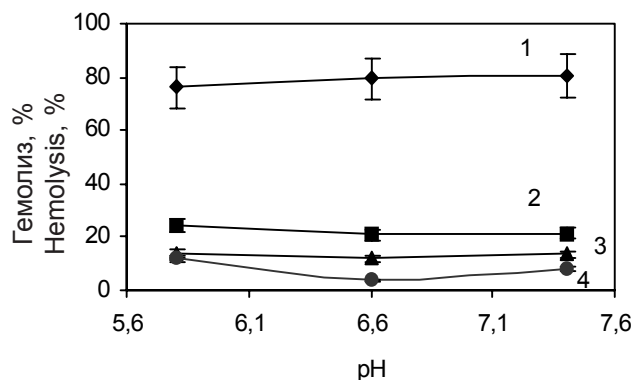


Рис. 1. Уровень постгипертонического лизиса эритроцитов в средах различного состава: 1 – 0,15 моль/л NaCl → 3 моль/л NaCl → 0,15 моль/л NaCl; 2 – 0,45 моль/л NaCl → 3 моль/л NaCl → 0,45 моль/л NaCl; 3 – 0,15 моль/л NaCl + 0,4 моль/л сахарозы → 3 моль/л NaCl + 0,4 моль/л сахарозы → 0,15 моль/л NaCl + 0,4 моль/л сахарозы; 4 – 0,15 моль/л NaCl + 15 % ПЭГ-1500 → 3 моль/л NaCl + 15% ПЭГ-1500 → 0,15 моль/л NaCl + 15% ПЭГ-1500.

Fig. 1. The level of red cells' posthypertonic lysis in the media with different composition: 1 – 0.15 mol/l NaCl → 3 mol/l NaCl → 0.15 mol/l NaCl; 2 – 0.45 mol/l NaCl → 3 mol/l NaCl → 0.45 mol/l NaCl; 3 – 0.15 mol/l NaCl + 0.4 mol/l sucrose → 3 mol/l NaCl + 0.4 mol/l sucrose → 0.15 mol/l NaCl + 0.4 mol/l sucrose; 4 – 0.15 mol/l NaCl + 15% PEG-1500 → 3 mol/l NaCl + 15% PEG-1500 → 0.15 mol/l NaCl + 15% PEG-1500.

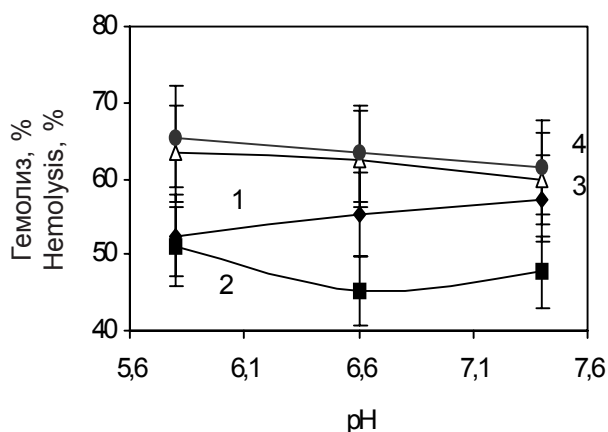


Рис. 2. Уровень постгипертонического повреждения эритроцитов в среде, содержащей 0,135 моль/л NaCl и 0,03 моль/л сахарозы: 1 – 0,15 моль/л NaCl → 3 моль/л NaCl; 2 – 0,45 моль/л NaCl → 3 моль/л NaCl; 3 – 0,15 моль/л NaCl + 0,4 моль/л сахарозы → 3 моль/л NaCl + 0,4 моль/л сахарозы; 4 – 0,15 моль/л NaCl + 15 % ПЭГ-1500 → 3 моль/л NaCl + 15 % ПЭГ-1500.

Fig. 2. The level of red cells' posthypertonic damage in the medium, comprised 0.135 mol/l NaCl and 0.03 mol/l sucrose: 1 – 0.15 mol/l NaCl → 3 mol/l NaCl; 2 – 0.45 mol/l NaCl → 3 mol/l NaCl; 3 – 0.15 mol/l NaCl + 0.4 mol/l sucrose → 3 mol/l NaCl + 0.4 mol/l sucrose; 4 – 0.15 mol/l NaCl + 15% PEG-1500 → 3 mol/l NaCl + 15% PEG-1500.

по сравнению с предыдущим экспериментом (рис.1). Применение 0,15 моль/л NaCl в качестве регидратирующей среды вызывает возрастание степени гемолиза по сравнению со средой, содержащей 0,135 моль/л NaCl и 0,03 моль/л сахарозы (рис. 3). Следует отметить отсутствие реакции клеток на изменение pH сред регидратации как для среды 0,135 моль/л NaCl + 0,03 моль/л сахарозы, так и для среды 0,15 моль/л NaCl.

Поскольку перенос оттаянных эритроцитов из раствора криопротектора, который представляет собой гипертонический раствор, в плазму крови или физиологический раствор (изоосмотические условия) сопровождается постгипертоническим лизисом, то регидратирующие среды разводили в 10-кратном объеме 0,15 моль/л NaCl с различными значениями pH. Уровень гемолиза клеток, регидратированных в средах, содержащих 0,15 моль/л NaCl; 0,45 моль/л NaCl; 0,15 моль/л NaCl + 0,4 моль/л сахарозы колебался от 80 до 70 % (рис. 4), а при регидратации в среде 0,15 моль/л NaCl + 15% ПЭГ-1500 отмечался различный уровень гемолиза: при pH 5,8 около 70 %, при pH 7,4 около 45 % (рис. 5, кривая 1). Как видно из рис. 5 (кривые 2 и 3), добавление в среду разведения (0,15 моль/л NaCl) ДИДСа и дипиридамола приводит к инверсии pH зависимости.

В основе постгипертонического лизиса лежит регидратация клеток, которая происходит после гипертонического воздействия. Во время регидратации увеличивается объем вследствие поступления воды вовнутрь клетки, за которой перераспределяются ионы. Известно [4], что pH

level of red cells hemolysis in the media with different pH values, are noted. Red cells, incubated in the medium, containing 0.15 mol/l NaCl and 0.4 mol/l sucrose and then placed into hypertonic solution with further reverse transfer into the medium with 0.15 mol/l NaCl and 0.4 mol/l sucrose, are characterised by low hemolysis level and the absence of pH-dependence (Fig. 1, curve 3). Red cells, being exposed to the medium with 0.15 mol/l NaCl + 15% PEG, in NaCl hypertonic solution and then transferred again into 0.15 mol/l NaCl + 15% PEG-1500, behave in a similar way (Fig. 1, curve 4).

Usage of rehydrating medium of the composition as 0.135 mol/l NaCl + 0.03 mol/l sucrose resulted in an increase of the hemolysis level (Fig. 2) comparing to the previous experiment (Fig. 1). Application of 0.15 mol/l NaCl as a rehydrating medium causes an increase of the hemolysis level in comparison with the medium, comprised 0.135 mol/l NaCl and 0.03 mol/l sucrose (Fig. 3). We should note the absence of cell response to pH change in rehydrating media both for the medium of 0.135 mol/l NaCl + 0.03 mol/l sucrose, and for 0.15 mol/l NaCl medium.

Whilst the transfer of frozen-thawed red cells out of a cryoprotectant solution, that is a hypertonic one, into blood plasma or physiological solution (isoosmotic conditions) was accompanied by a posthypertonic lysis, rehydrating media were diluted by 10 times by 0.15 mol/l NaCl with different pH values. The level of cell hemolysis, rehydrated in the media, comprised 0.15 mol/l NaCl; 0.45 mol/l NaCl; 0.15 mol/l NaCl + 0.4 mol/l sucrose was hesitating from 80 to 70% (Fig. 4), and during the rehydration in the medium with 0.15 M/l NaCl + 15% PEG-1500 there was noted a different

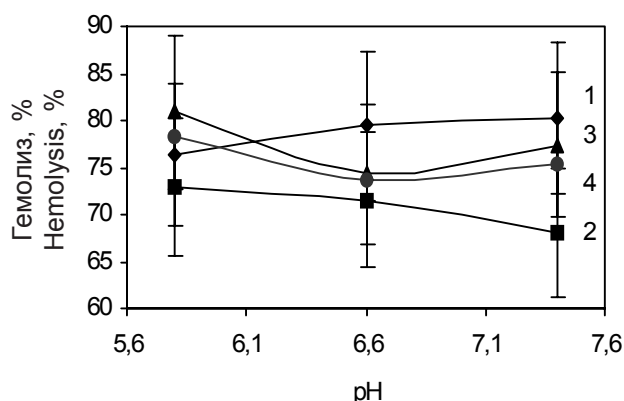


Рис. 3. Уровень постгипертонического повреждения эритроцитов в среде, содержащей 0,15 моль/л NaCl: 1 – 0,15 моль/л NaCl → 3 моль/л NaCl; 2 – 0,45 моль/л NaCl → 3 моль/л NaCl; 3 – 0,15 моль/л NaCl + 0,4 моль/л сахарозы → 3 моль/л NaCl + 0,4 моль/л сахарозы; 4 – 0,15 моль/л NaCl + 15 % ПЭГ-1500 → 3 моль/л NaCl + 15 % ПЭГ-1500.

Fig. 3. The level of red cells' posthypertonic damage in the medium comprised 0.15 mol/l NaCl: 1 – 0.15 mol/l NaCl → 3 mol/l NaCl; 2 – 0.45 mol/l NaCl → 3 mol/l NaCl; 3 – 0.15 mol/l NaCl + 0.4 mol/l sucrose → 3 mol/l NaCl + 0.4 mol/l sucrose; 4 – 0.15 mol/l NaCl + 15% PEG-1500 → 3 mol/l NaCl + 15% PEG-1500.

зависимость постгипертонического лизиса слабо выражена или практически отсутствует в широком диапазоне рН от 4 до 9. Однако показано, что гипотонический гемолиз существенно зависит от рН среды [3, 8]. В основе данных различий лежит механизм изменения объёма клетки, связанный с рН зависимым распределением хлорида. Отмечено, что в этом процессе ведущая роль принадлежит перераспределению анионов хлора между вне- и внутриклеточной средами. Соотношение концентраций внутриклеточного хлорида к внеклеточному зависит от рН среды, и при рН 7,4 данное отношение меньше 1, при рН 6,6 оно составляет примерно 1, при рН 5,8 больше 1 [6].

Известно, что при гипотоническом гемолизе его уровень значительно изменяется при варьировании значений рН: при снижении степень гемолиза увеличивается [3, 8], так как при более низких рН быстрее достигается критический гемолитический объём благодаря перераспределению хлорида внутрь клетки. Поскольку при гипотоническом гемолизе отмечается рН зависимость с изменением рН среды инкубации [3, 8], а при постгипертоническом лизисе не отмечается (хотя и в том и в другом случаях клетка увеличивает свой объём [5-7]), можно предположить, что при постгипертоническом лизисе эритроциты повреждаются уже на этапе гипертонической инкубации. Эти повреждения обуславливают увеличение проницаемости мембраны для хлоридных анионов на этапе регидратации, вследствие чего механизм рН зависимого изменения объёма клетки и рН зависимость гемолиза в изотонических средах не выявляются (рис. 2 и 3). Низкий уровень гемолиза в гипертонических регидратирующих средах без видимой рН зависимости даже в присутствии криопротектора ПЭГ-1500, по-видимому, объясняется особенностями осмотического механизма постгипертонического лизиса. Известно, что

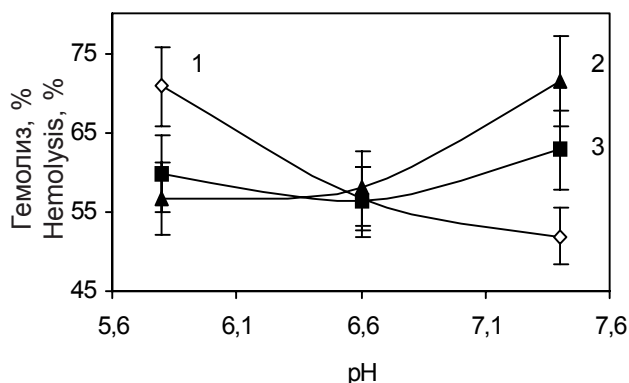


Рис. 5. Влияние разведения среды регидратации, содержащей 0,15 моль/л NaCl + 15% ПЭГ-1500, на постгипертонический лизис эритроцитов: 1 – контроль; 2 – 5 мкмоль/л ДИДС; 3 – 20 мкмоль/л дипиридамола.

Fig. 5. The effect of dilution of the rehydration medium, containing 0.15 mol/l NaCl + 15% PEG-1500, on red cells' posthypertonic lysis: 1 – the control; 2 – 5 μmol/l DIDS; 3 – 20 μmol/l dipyrindamole.

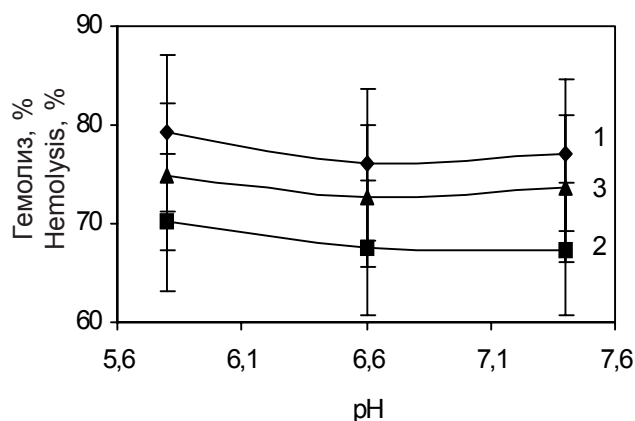


Рис. 4. Влияние разведения следующих сред регидратации на постгипертонический лизис эритроцитов: 1 – 0,15 моль/л NaCl; 2 – 0,45 моль/л NaCl; 3 – 0,15 моль/л NaCl + 0,4 моль/л сахарозы; 4 – 0,15 моль/л NaCl + 15% ПЭГ-1500.

Fig. 4. The dilution effect of the following rehydration media on red cells' posthypertonic lysis: 1 – 0.15 mol/l NaCl; 2 – 0.45 mol/l NaCl; 3 – 0.15 mol/l NaCl + 0.4 mol/l sucrose; 4 – 0.15 mol/l NaCl + 15% PEG-1500.

hemolysis level (under pH 5.8 it made about 70%, at pH 7.4 it was about 45%) (Fig. 5, curve 1). As the Fig. 5 shows (curves 2 and 3), DIDS and dipyrindamole addition into a diluted medium (0.15 M/l NaCl) has resulted into the inversion of pH dependence.

Cell rehydration is in the base of posthypertonic lysis, it follows a hypertonic effect. During rehydration the volume increases due to water release inside a cell, where ions redistribution occurs. It is known [4] that pH-dependence of posthypertonic lysis is slightly manifested or practically absent within a wide pH spectrum from 4 to 9. However it has been demonstrated that hypotonic hemolysis significantly depends on the medium pH [3, 8]. In the base of given differences there is the mechanism of a cell volume change, related to pH-dependent chloride distribution. It has been noted, that the main role in this process belongs to chlorine anions redistribution between extra- and intracellular media. The ratio of intracellular chloride concentrations to extracellular ones depends on the medium pH, and at pH 7.4 this ratio is less than 1, at pH 6.6 this value is approximately 1, at pH 5.8 it is more than 1 [6].

It is a well known fact that at a hypotonic hemolysis its level is considerably changed when varying the pH values: at its decrease the hemolysis level increases [3, 8], because at lower pH the critical hemolytic volume is achieved quickly owing to chloride redistribution inside a cell. As under hypotonic hemolysis the pH dependence is noted with the pH change in an incubation medium [3, 8], it is not observed at posthypertonic lysis [3] (although in both cases the cell increases its volume [5-7]), it can be supposed, that red blood cells under posthypertonic lysis have already been damaged at the stage of hypertonic incubation. These damages substantiated an increase of membrane permeability for chloride anions at the stage of rehydration due to which no mechanisms of pH-dependent change in a

применение ПЭГ-1500 в качестве криопротектора при замораживании эритроцитов позволяет получить хорошую сохранность клеток [1, 2], однако при ресуспендировании эритроцитов из среды размораживания отмечается значительный гемолиз [2], что свидетельствует о существенном повреждении мембран клеток в процессе замораживания-оттаивания. Тот факт, что применение ПЭГ-1500 способствует появлению рН зависимости при разведении регидратирующей среды, вероятно, можно объяснить тем, что остаточная фракция эритроцитов, которая не гемолизуется при рН 7,4 (около 50 %), способна отвечать ростом своей чувствительности к повреждению при снижении рН. Эти результаты также подтверждает инверсия рН зависимости ингибиторами анионного транспорта, которые блокируют перераспределение анионов хлора через анионный переносчик.

Разведение регидратирующих сред, включающих 0,45 моль/л NaCl, 0,15 моль/л NaCl и 0,4 моль/л сахарозы, показывает отсутствие способности остаточной фракции эритроцитов реагировать на изменение рН среды после регидратации. Последнее может свидетельствовать о том, что криопротектор ПЭГ-1500, в отличие от сахарозы, во время разведения регидратирующей среды способен предотвращать повреждения у части клеток. Причём присутствие данного криопротектора необходимо прежде всего в регидратирующей среде, поскольку только в этом случае при ее разведении в полученных изотонических условиях обнаруживается фракция клеток, способная отвечать на изменение рН.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют:

1) гипертонические регидратирующие среды в значительной степени предотвращают повреждение эритроцитов, однако при этом клетки не изменяют свою чувствительность к новым осмотическим условиям при сдвиге рН среды;

2) разведение гипертонических сред регидратации приводит к значительному лизису эритроцитов, который менее выражен в присутствии криопротектора ПЭГ-150;

3) при применении ПЭГ-1500 выявляется рН зависимость, которую снимают ингибиторы анионного канала.

Литература

1. *Бабичук Л.А., Землянских Н.Г.* Влияние температуры и криопротектора ПЭО-1500 на характер модификации белков цитоскелета и устойчивость эритроцитов в процессе криоконсервирования // Пробл. криобиологии.– 1994.– №2.– С. 7-11.
2. *Мартыненко А.А., Луговой В.И.* Влияние ПЭО-1500 и низких температур на изоосмотическую резистентность эритроцитов человека // Криобиология и криомедицина.– 1981.– Вып. 8.– С. 22-24.

cell volume and pH-dependence of hemolysis in isotonic media are revealed (Fig. 2 and 3).

Low hemolysis level in hypertonic rehydrating media without an obvious pH-dependence even in the presence of PEG-1500 cryoprotectant, has been explained, probably, by the peculiarities of osmotic mechanism of posthypertonic lysis. It is known that PEG-1500 application as a cryoprotectant during red cells freezing allowed to obtain a high cell stability [1, 2], however when red cell resuspending out of a freezing medium a significant hemolysis is noted [2], that testifies to a significant damage of cell membranes during the process of freeze-thawing. The fact that PEG-1500 application promotes to the appearance of pH-dependence when diluting the rehydrating medium, can be explained, probably, by the fact that a residual red cell fraction, which does not hemolyse under pH 7.4 (about 50%), is capable of responding by the growth of its susceptibility to damage at pH reduction. These results are also confirmed by the inversion of pH dependence by the inhibitors of anions transport, blocking the redistribution of chlorine anions via anionic transporter.

Dilution of rehydrating media comprised 0.45 M/l NaCl, 0.15 M/l NaCl and 0.4 M/l sucrose, has shown the absence of the capability of residual red cell fraction to respond to pH change of the medium after rehydration. The latter fact can testify that during the dilution of rehydrating medium the PEG-1500 cryoprotectant in contrast to sucrose, is capable of preventing the damage in a part of cells. The presence of given cryoprotectant is first of all necessary in a rehydrating medium, because only in this case at its dilution under obtained isotonic conditions the cell fraction, capable of responding to the pH change is found.

Thus, the data obtained by us testify that:

1) hypertonic rehydrating media significantly prevent the erythrocytes' damage, however in this case the cells do not change their susceptibility to new osmotic conditions at pH shift in the medium;

2) dilution of hypertonic rehydration media has resulted in a considerable red cell lysis, less manifested in the presence of PEG-1500 cryo-protectant;

3) when using PEG-1500 the pH dependence is revealed, which is cancelled by the inhibitors of anion channel.

References

1. *Babichuk L.A., Zemlyanskikh N.G.* The effect of temperature and PEO-1500 cryoprotectant on the character of the cytoskeleton proteins modification and red cells stability during the process of cryopreservation // Problems of Cryobiology.– 1994.– N2.– P. 7-11.
2. *Martynenko A.A., Lugovoy V.I.* The effect of PEO-1500 and low temperatures on isoosmotic resistance of human red blood cells // Kriobiologiya i Kriomeditsina.– 1981.– Issue N8.– P. 22-24.

3. Олейник О.А., Абу-Аль Асаль Ф., Рамазанов В.В. Влияние ингибиторов анионного канала на постгипертонический лизис эритроцитов // Пробл. криобиологии.– 2002.– № 1.– С.117-119.
4. Пателарос С.В. Влияние моновалентных катионов Na⁺, K⁺, H⁺ на развитие осмотических мембранных повреждений эритроцитов, активируемых ионами Ca²⁺ и Zn²⁺ // Пробл. криобиологии.– 1998.– №4.– С. 26-30.
5. Руденко С.В., Бондаренко В.А. Роль изменения объема эритроцитов при постгипертоническом лизисе // Моделирование криобиологических процессов.– Харьков.– 1988.– С. 55-66.
6. Glaser R., Svetina S., Brumen M. et al. Stationary ionic states of human red blood cells – consequences for planing and evaluation of experiments // Studia biophysica.– 1980.– 81.– №2.– P. 43-47.
7. Rudenko S., Patelaros S. Cation-sensitive pore formation in rehydrated erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta.– 1995.– 1235.–P. 1-9.
8. Sato Y., Yamokose H., Susuki Y. Participation of band 3 protein in hypotonic hemolysis of human erythrocytes // Biol. Pharm. Bull.– 1993.– 16.– № 2.– P. 188-193.
3. Olejnik O.A., Abu-Al Asal F., Ramazanov V.V. The effect of anion channel inhibitors on red cells posthypertonic lysis // Problems of Cryobiology.– 2002.– N1.– P. 117-119.
4. Patelaros S.V. Effect of monovalent cations Na⁺, K⁺, H⁺ on the development of osmotic membrane damages in red cells, being activated by Ca²⁺ and Zn²⁺ ions // Problems of Cryobiology.– 1998.– N4.– P. 26-30.
5. Rudenko S.V., Bondarenko V.A. The role of the volume change in red blood cells under posthypertonic lysis // Modeling of Cryobiological Processes.– Kharkov.– 1988.– P. 55-66.
6. Glaser R., Svetina S., Brumen M. et al. Stationary ionic states of human red blood cells – consequences for planing and evaluation of experiments // Studia biophysica.– 1980.– 81.– №2.– P. 43-47.
7. Rudenko S., Patelaros S. Cation-sensitive pore formation in rehydrated erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta.– 1995.– 1235.–P. 1-9.
8. Sato Y., Yamokose H., Susuki Y. Participation of band 3 protein in hypotonic hemolysis of human erythrocytes // Biol. Pharm. Bull.– 1993.– 16.– № 2.– P. 188-193.

Accepted in 25.06.2002

Поступила 25.06.2002