

Исходное состояние эритроцитов – фактор, определяющий их чувствительность к гипертоническому стрессу. Роль ПЭО-1500 и температуры

UDC 57.043:547.422:612.111:577.352.462

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

Initial State of Erythrocytes as Factor, Determining Their Sensibility to Hypertonic Stress. Role of PEO-1500 and Temperature

Исследовали влияние ПЭО-1500 на устойчивость эритроцитов человека, быка и лошади к гипертоническому шоку (4,0 М NaCl) при 37 и 0°C. Показали, что снижение объема эритроцитов млекопитающих при увеличении концентрации растворов ПЭО-1500 сопровождается повышением устойчивости клеток к действию гипертонического шока при 37 и 0°C.

Ключевые слова: эритроциты млекопитающих, ПЭО-1500, гипертонический шок, гематокрит, осмолярность среды.

Досліджували вплив ПЕО-1500 на стійкість еритроцитів людини, бика і коня до гіпертонічного шоку (4,0 М NaCl) при 37 і 0°C. Показали, що зниження об'єму еритроцитів ссавців при збільшенні концентрації розчинів ПЕО-1500 супроводжується підвищенням стійкості клітин до дії гіпертонічного шоку при 37 і 0°C.

Ключові слова: еритроцити ссавців, ПЕО-1500, гіпертонічний шок, гематокрит, осмолярність середовища.

The effect of PEO-1500 on resistance of human, bovine and equine erythrocytes to hypertonic shock (4.0 M NaCl) under 37 and 0°C was studied. It has been shown that decrease of mammalian erythrocyte volume with PEO-1500 concentration increase is accompanied by rise in cell resistance to the activity of hypertonic shock under 37 and 0°C.

Key words: mammalian erythrocytes, PEO-1500, hypertonic shock, hematocrit, medium osmolarity.

Для криоконсервирования клеток, тканей и органов используют непроникающие криопротекторы: полиэтиленоксиды (ПЭО), фико́лл, сахарозу, трегалозу, декстраны, оксиэтилированный крахмал [13, 15]. Применение непроникающих криопротекторов связано с трудностями выбора условий эквilibрации (температуры, скорости введения криопротектора, его концентрации) [11, 14, 16]. Изучение процессов, происходящих при введении и удалении криопротектора, имеет важное значение для криоконсервирования клеток, органов и тканей. Несмотря на многочисленные работы по криоконсервированию различных объектов [3, 5, 8], условия для введения криопротекторов часто подбирают интуитивно. В [2, 4, 11] отмечены целесообразность применения ПЭО-1500 в качестве криоконсерванта для эритроцитов млекопитающих и видовые различия их сохранности при замораживании в зависимости от условий предварительной эквilibрации клеток с криопротектором.

Цель работы – исследовать влияние непроникающего криопротектора ПЭО-1500 на чувствительность эритроцитов разных видов млекопи-

For cryopreservation of cells, tissues and organs the non-penetrating cryoprotectants such as: polyethylene oxides (PEO), ficoll, sucrose, trehalose, dextrans and hydroxyethyl starch [13, 15] have been used. Application of non-penetrating cryoprotectant is associated with the difficulties of equilibration conditions selection as: temperature, cryoprotectant introduction rate and its concentration [11, 14, 16]. Study of processes, taking place during introduction and removal of cryoprotectant has an important role for cell, organ and tissue cryopreservation. In spite of multiple works for cryopreservation of different objects [3, 5, 8] the conditions for cryoprotectant introduction are often tentatively selected. In the works [2, 4, 11] the applicability of PEO-1500 as cryopreservative for mammalian erythrocytes and species differences of their integrity during freezing depending on the conditions of preliminary cell equilibration with cryoprotectant were noted.

The research aim was to study the effect of PEO-1500 non-penetrating cryoprotectant on erythrocyte sensibility of different mammalian species (human, bovine and equine) to the activity of 4.0 M NaCl under 37 and 0°C.

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

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

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

* 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

тающих (человека, быка и лошади) к действию 4,0 М NaCl при 37 и 0°C.

Материалы и методы

Эритроциты получали из донорской крови человека, быка и лошади, заготовленной на глицериновом консерванте. После удаления плазмы эритроциты дважды отмывали центрифугированием 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 2 ч при температуре 0°C. Все используемые в работе среды готовили на 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,4. Концентрацию растворов контролировали измерением осмолярности на осмометре ОМКА 1Ц-01 (Украина).

Эритроциты млекопитающих инкубировали в 5–20%-х растворах ПЭО-1500, приготовленных на физиологическом растворе при 37 или 0°C (2 мин), затем переносили на 5 мин в 4,0 М NaCl при соответствующих температурах (гематокрит 0,4 %). Количество гемоглобина в супернатанте определяли спектрофотометрически ($\lambda = 543$ нм) и выражали в процентах по отношению к 100%-му гемолизу эритроцитов в присутствии тритона X-100 (0,1%).

Изменение объема эритроцитов в растворах ПЭО-1500 определяли микрогематокритным методом. В работе использовали реактивы отечественного производства квалификации “х. ч.” и “ч. д. а”. Исследовали кровь 6 доноров в 2-х параллельных пробах. Результаты анализировали с помощью тестов Mann-Whitney и ANOVA.

Результаты и обсуждение

На рисунке (кривая 2) представлены результаты исследования влияния разных концентраций ПЭО-1500 на уровень гемолиза эритроцитов различных видов млекопитающих в гипертоническом растворе NaCl (4,0 М).

Следует отметить, что уровень гипертонического повреждения в 4,0 М NaCl эритроцитов человека, лошади и быка при 37°C составляет 84, 48 и 75% соответственно. При низкой температуре показатели гипертонического повреждения клеток снижаются, что особенно выражено для эритроцитов лошади и быка, уровни гипертонического гемолиза которых составляют около 20%.

Для эритроцитов человека (рисунок а, кривая 2) при 37°C наблюдается ярко выраженная зависимость гипертонического гемолиза от концентрации ПЭО-1500. Минимальный уровень гемолиза эритроцитов человека в среде, содержащей 4,0 М NaCl, отмечается после обработки клеток 20%-м ПЭО-1500. При 0°C характер концентрационной зависимости гипертонического гемолиза эритро-

Materials and methods

Erythrocytes were derived from human, bovine and equine donor blood, procured with glyceric preservative. After plasma removal the erythrocyte mass 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 hrs under 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 osmolarity measuring with OMKA 1C-01 (Ukraine).

Mammalian erythrocytes were incubated in 5–20% PEO-1500 solutions, prepared with physiological solution under 37 or 0°C (2 min), later removed for 5 min into 4.0 M NaCl under corresponding temperatures (0.4% hematocrit). Hemoglobin number in supernatant was spectrophotometrically determined ($\lambda = 543$ nm) and expressed in percentage relative to 100% hemolysis of erythrocytes in the presence of X-100 triton (0.1%).

Changes of erythrocyte volume in PEO-1500 solutions were determined by microhematocrit method. Nationally produced reagents of “chemically pure” and “pure for analysis” grades were used in the work. Blood of 6 donors in 2 parallel samples has been studied. The results were processed with Mann-Whitney and ANOVA tests.

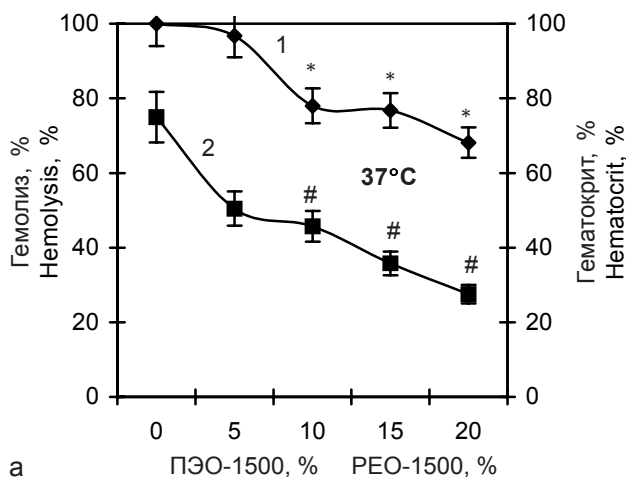
Results and discussion

In the Figure (curve 2) the research results of different PEO-1500 concentrations effect on erythrocyte hemolysis level of various species of mammals in NaCl hypertonic solution (4.0 M) were shown.

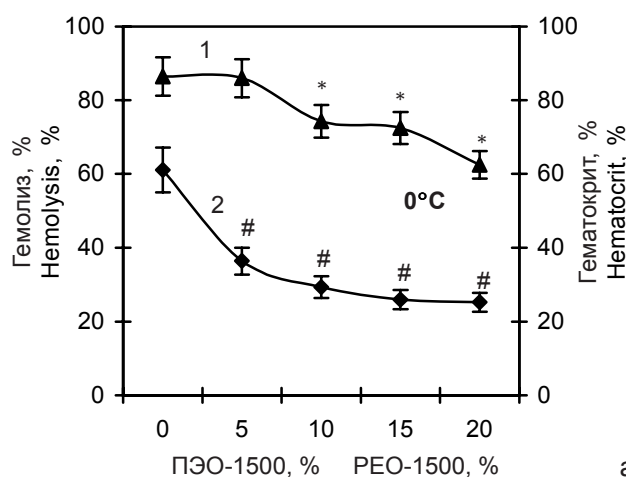
It should be noted that the level of hypertonic damage in 4.0 M NaCl of human, equine and bovine erythrocytes under 37°C makes 84, 48 and 75%, accordingly. Under low temperature the indices of hypertonic damage decreased, that was especially expressed for equine and bovine erythrocytes, which hypertonic hemolysis levels made about to 20%.

For human erythrocytes (Fig. a, curve 2) under 37°C the strongly expressed dependence of hypertonic hemolysis from PEO-1500 concentration is observed. Minimal level of human erythrocyte hemolysis in the medium, containing 4.0 M NaCl is observed after cell treatment with 20% PEO-1500. At 0°C the character of concentration dependence of human erythrocyte hypertonic hemolysis changes. When using 5% PEO-1500 there is observed a sharp reduction of cell damage, achieving the minimal value under 10% PEO-1500 and then does not practically change.

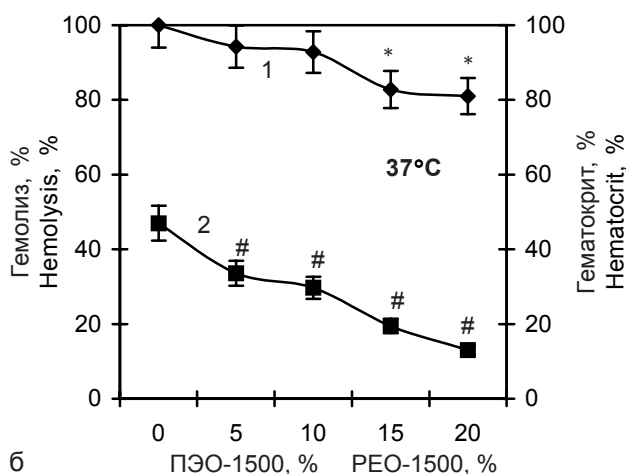
For bovine erythrocytes (Fig. c, curve 2) the dependence of hypertonic hemolysis under 37 and 0°C is similar to the ones, obtained for human erythrocytes under corresponding temperatures. However under maximally used PEO-1500 concentration the hyper-



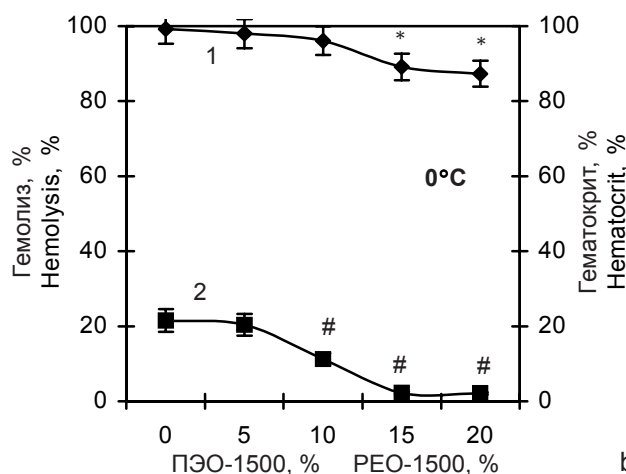
a



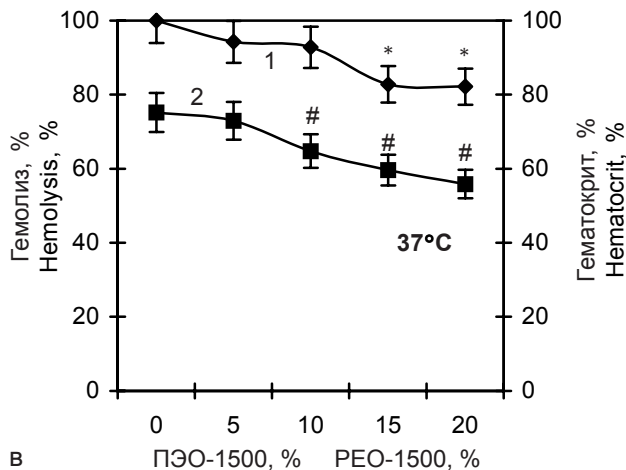
a



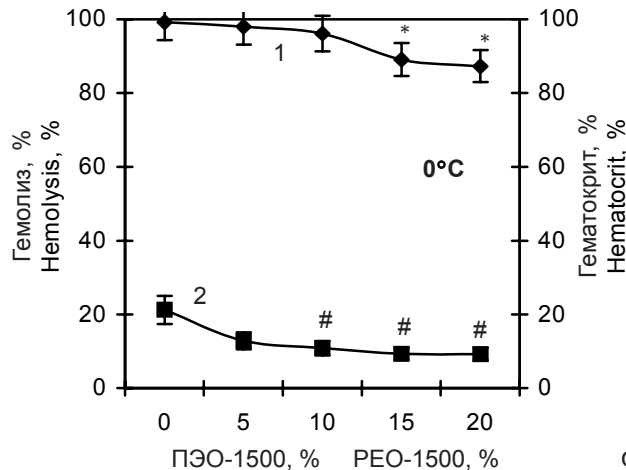
б



б



в



в

Влияние ПЭО-1500 на изменение гематокрита (1) и гемолитическое повреждение (2) эритроцитов человека (а), лошади (б) и быка (в) при последующем перенесении их в 4,0 М NaCl при температуре 37 и 0°C: * – достоверно в сравнении с контрольными эритроцитами, $p < 0,05$; # – достоверно в сравнении с контрольными эритроцитами, $p < 0,05$.

Effect of PEO-1500 on hematocrit change (1) and hemolytic damage (2) of human (a), equine (b) and bovine (c) erythrocytes during their following transfer into 4.0 M NaCl under 37 and 0°C: * – statistically significant if compared with the control erythrocytes, $p < 0.05$; # – statistically significant if compared with the control erythrocytes, $p < 0.05$.

цитов человека изменяется. При использовании ПЭО-1500 в концентрации 5% наблюдается резкое снижение повреждения клеток, которое достигает минимального значения при 10%-м ПЭО-1500 и затем практически не изменяется.

tonic hemolysis level of bovine cells under 37°C is lower, versus human erythrocytes. In spite of initially low level of bovine erythrocyte hypertonic hemolysis under 0°C (about to 20%), previous treatment of PEO-1500 cells enables to reduce their damage.

Для эритроцитов быка (рисунок в, кривая 2) зависимость гипертонического гемолиза при 37 и 0°C аналогична зависимостям, полученным для эритроцитов человека при соответствующих температурах. Однако при максимально используемой концентрации ПЭО-1500 уровень гипертонического гемолиза клеток быка при 37°C ниже, чем для эритроцитов человека. Несмотря на изначально низкий уровень гипертонического гемолиза эритроцитов быка при 0°C (около 20%), предобработка клеток ПЭО-1500 позволяет снизить их повреждение.

Для эритроцитов лошади (рисунок б, кривая 2) при 37°C характер концентрационной зависимости сохраняется, как для эритроцитов человека и быка, а при 0°C в отличие от клеток других млекопитающих не наблюдается снижения гипертонического гемолиза при использовании криопротектора в низкой концентрации (5%), а максимальное снижение уровня гемолиза отмечено при 15–20% ПЭО-1500.

Обработка эритроцитов разных видов млекопитающих 20%-м ПЭО-1500 приводит к снижению уровня повреждения клеток при перенесении в 4,0 М NaCl как при 37, так и 0°C. Следует отметить, что для эритроцитов человека при обоих температурных режимах гипертонический гемолиз составляет около 26%. Для клеток животных уровень повреждения зависит от температуры и составляет при 37°C для клеток быка и лошади 44 и 13%, а при 0°C – 9 и 3% соответственно.

В экспериментальных работах по замораживанию эритроцитов млекопитающих использовали 15% ПЭО-1500 [2, 4]. Эритроциты человека и быка экспонировали с ПЭО-1500 при разных температурах (0 и 22°C), а затем подвергали быстрому замораживанию до –196°C. Было показано, что для эритроцитов человека [2] и быка [4] более высокая сохранность клеток наблюдается в случае введения криопротектора при околонулевой температуре. Эритроциты лошади после размораживания характеризуются очень низким уровнем повреждения (<1%), поэтому влияние температуры не отмечено [4].

Анализ полученных данных по гипертоническому гемолизу эритроцитов млекопитающих при использовании криопротектора в концентрации 15% (рисунок) согласуется с тем, что повреждение клеток ниже, если криопротектор вводили в среду при более низкой температуре (0°C). Для эритроцитов человека, быка и лошади уровень гемолиза в присутствии 15% ПЭО-1500 при 37°C составляет 36, 50 и 23%, а при 0°C – 28, 9 и 3% соответственно. Следует отметить, что при использовании ПЭО-1500 в диапазоне высоких концентраций (15–20%) раз-

For equine erythrocytes (Fig. b, curve 2) under 37°C the type of concentration dependence is preserved both for human and bovine erythrocytes, and under 0°C in contrast to the cells of other mammals the reduction of hypertonic hemolysis is not observed when using cryoprotectant low concentration of 5%, but maximal decrease of hemolysis level is noted under 15–20% PEO-1500.

The erythrocyte treatment of different species of mammals with 20% PEO-1500 results in reduction of cell damage level during removal into 4.0 M NaCl not only under 37, but also 0°C. It should be noted that for human erythrocytes under both temperature regimens the hypertonic hemolysis makes nearly 26%. For animal cells the damage level depends on temperature and makes 44 and 13% under 37°C for bovine and equine cells, but under 0°C does 9 and 3%, accordingly.

In the experimental works for mammalian erythrocyte freezing 15% PEO-1500 was used [2, 4]. Human and bovine erythrocytes were exposed to PEO-1500 under different temperatures (0 and 22°C), and then were rapidly frozen down to –196°C. It has been shown that for human [2] and bovine [4] erythrocytes higher cell survival is observed in case of cryoprotectant introduction at temperatures about zero. Equine erythrocytes after freezing are characterized by very low damage level (<1%), therefore the temperature effect is not noted [4].

The analysis of the obtained data for hypertonic hemolysis of mammalian erythrocytes when using 15% cryoprotectant (Figure) consistent with that cell damage is lower, if cryoprotectant was introduced into the medium under lower temperature (0°C). For human, bovine and equine erythrocytes the hemolysis level in the presence of 15% PEO-1500 under 37°C makes 36, 50 and 23%, but under 0°C is 28, 9 and 3%, accordingly. It should be noted that when using PEO-100 within the range of high concentrations (15–20%) the dependencies at the level of erythrocyte hypertonic hemolysis under 37 and 0°C are the lower, the higher is cryoprotectant concentration.

PEO-1500 is a polymer compound, the molecules of which are not able to get through erythrocyte membranes [7]. During cryopreservation of biological material its protective effect is connected with ability to remove water from cell, thereby preventing a process of intracellular crystallization. The change of volume characteristics of mammalian erythrocytes in the presence of different concentrations of PEO-1500 cryoprotectant under 37 and 0°C was studied.

In the Figure (curve 1) the results of volume change of human, equine and bovine erythrocytes in PEO-1500 solutions under 37 and 0°C were shown. It is seen that with increase of PEO-1500 concentration in

личия в уровне гипертонического гемолиза эритроцитов при 37 и 0°C тем меньше, чем выше концентрация криопротектора.

ПЭО-1500 является полимерным соединением, молекулы которого не способны проходить через эритроцитарные мембраны [7]. Его защитный эффект при криоконсервировании биологического материала связан со способностью удалять воду из клетки, тем самым предотвращая процесс внутриклеточной кристаллизации. Исследовали изменение объемных характеристик эритроцитов млекопитающих в присутствии разных концентраций криопротектора ПЭО-1500 при 37 и 0°C.

На рисунке (кривая 1) представлены результаты по изменению объема эритроцитов человека, лошади и быка в растворах ПЭО-1500 при 37 и 0°C. Видно, что по мере увеличения концентрации ПЭО-1500 в среде объем эритроцитов млекопитающих снижается и достигает минимальных значений при 20% ПЭО-1500.

Следует отметить, что уменьшение клеточного объема эритроцитов млекопитающих в концентрированных растворах криопротектора (рисунок, кривая 1) сопровождается снижением уровня гипертонического гемолиза клеток в 4,0 М NaCl (кривая 2).

Было показано [1], что при 37 и 0°C изменение объема эритроцитов млекопитающих на этапе предварительной инкубации в умеренно концентрированных солевых средах коррелирует со снижением уровня гемолиза при последующем перенесении этих клеток в среду, содержащую 4,0 М NaCl. Для эритроцитов человека и лошади такой средой предварительного обезвоживания является раствор NaCl в концентрации 0,4 М, осмотическое давление которого примерно соответствует значению осмотического давления 20%-го раствора ПЭО-1500, приготовленного на физиологическом растворе (850 мОсм/кг) [6, 17]. Таким образом, независимо от качественного состава среды, в которой происходит предварительное обезвоживание клеток человека и лошади, наблюдаются максимальное изменение клеточного объема и минимальный уровень гипертонического повреждения этих эритроцитов при перенесении в 4,0 М NaCl.

Максимально устойчивое состояние эритроцитов быка к действию 4,0 М NaCl наблюдается после предварительного обезвоживания в среде, содержащей NaCl в концентрации 1,0 М, что соответствует осмолярности примерно 2000 мОсм/кг [1]. Подобную осмолярность растворы ПЭО-1500 имеют при использовании в такой концентрации, которая не пригодна для работы с биологическими объектами. Высокие концентрации ПЭО-1500 могут вызывать агрегацию эритроцитов, образова-

medium the mammalian erythrocyte volume reduces and achieves minimal values under 20% PEO-1500.

It should be noted that reduction of cell volume of mammalian erythrocytes in concentration solutions of cryoprotectant (Figure, curve 1) is accompanied with decreasing level of cell hypertonic hemolysis in 4.0 М NaCl (curve 2).

It has been shown [1] that under 37 and 0°C the change of mammalian erythrocyte volume at the stage of preliminary incubation in moderate concentration salt media correlates with decrease of hemolysis level at following transfer of these cells into the medium, containing 4.0 М NaCl. For human and equine erythrocytes this medium of preliminary dehydration is NaCl solution of 0.4 М concentration, which osmotic pressure approximately corresponds to the value of osmotic pressure of 20% PEO-1500 solution, prepared with physiological solution (850 mOsm/kg) [6, 17]. Thus, independently on qualitative composition of the medium, wherein preliminary dehydration of human and equine cells occurs, there are observed maximal change of cell volume and minimal level of hypertonic damage of these erythrocytes being removed into 4.0 М NaCl.

Maximally resistant state of bovine erythrocytes to 4.0 М NaCl effect is observed after preliminary dehydration in the medium, containing 1.0 М NaCl, that corresponds to osmolarity approximately 2000 mOsm/kg [1]. PEO-1500 solutions have equal osmolarity when using this concentration, which is unsuitable for work with biological objects. High concentrations of PEO-1500 may trigger erythrocyte aggregation, formation of pores in erythrocyte membranes, distribution of polar and hydrophobic membrane components, stabilizing lipid levels [16, 18].

It should be noted that when using non-penetrating cryoprotectant PEO-1500 (20%) the decrease of cell volume and level of bovine erythrocyte hypertonic hemolysis in 4.0 М NaCl (Fig. c) is observed, however those minimal values of cell volume and level of hypertonic damage of the cells, derived when using as 1.0 М NaCl dehydration media, are not managed to be achieved.

Mammalian erythrocytes used in the work are differed for dominant intracellular cation. Human and equine erythrocytes have K⁺ cations, but bovine has Na⁺ ones. In addition, these cells are differed by composition of intracellular water [9]. The feature of cytoskeletal-membrane complex of the studied erythrocytes is an absence in equine erythrocytes of 4.2 М protein, which are classified as anchorage proteins, binding integral proteins with cytoskeletal complex [10]. Bovine erythrocyte membranes in contrary to human and equine ones are enriched with sphingomyelin and are characterized by a high cholesterol content [12].

ние пор в эритроцитарных мембранах, перераспределение полярных и гидрофобных компонентов мембраны, стабилизирующих липидные слои [16, 18].

Следует отметить, что при использовании непроницающего криопротектора ПЭО-1500 (20%) наблюдается снижение клеточного объема и уровня гипертонического гемолиза эритроцитов быка в 4,0 М NaCl (рисунок в), однако тех минимальных значений клеточного объема и уровня гипертонического повреждения клеток, полученных при использовании в качестве среды обезвоживания 1,0 М NaCl [1], не удается достигнуть.

Используемые в работе эритроциты млекопитающих различаются по доминирующему внутриклеточному катиону: эритроциты человека и лошади содержат катионы K^+ , а быка – Na^+ [9]. Кроме того, эти клетки различаются по содержанию внутриклеточной воды [9]. Особенностью цитоскелет-мембранного комплекса исследуемых эритроцитов является отсутствие в эритроцитах лошади белка полосы 4,2, который относится к якорным белкам, связывающим интегральные белки с цитоскелетным комплексом [10]. Эритроцитарные мембраны быка, в отличие от эритроцитов человека и лошади, обогащены сфингомиелином и характеризуются высоким содержанием холестерина [12].

Выводы

Несмотря на особенности эритроцитов разных видов млекопитающих (человека, лошади, быка) и, как следствие, их различную чувствительность к гипертоническому стрессу, уровень гипертонического гемолиза эритроцитов можно снизить их предварительным обезвоживанием. Универсальным фактором, позволяющим снизить чувствительность эритроцитов млекопитающих к действию 4,0 М NaCl, является осмолярность среды предварительной инкубации клеток независимо от ее качественного состава.

Литература

1. Александрова Д.И., Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Сравнительное исследование чувствительности предварительно обезвоженных эритроцитов человека и быка к гипертоническому стрессу // Пробл. криобиологии.– 2007.– Т.17, №4.– С. 327–334.
2. Бабичук Л.А. Механизмы температурно-осмотической стабилизации эритроцитов при охлаждении и замораживании в присутствии непроницающего криопротектора: Дис. ... д-ра биол. наук.– Харьков, 2002.– 299 с.
3. Горбунов Л.В., Морозова И.А., Ващенко А.В. та інші. Температура внутрішньоклітинного кристалоутворення ікри коропа // Ветеринарна біотехнологія. Аграрна наука.– 2004.– №5.– С. 19–23.

Conclusions

In spite of the peculiarities of erythrocytes of different mammalian species (human, equine, bovine) and as a consequence their various sensitivities to hypertonic stress, the level of hypertonic hemolysis of erythrocytes may be reduced by their preliminary dehydration. The generalized factor enabling to reduce the sensitivity of erythrocytes of different mammalian species to the effect of 4.0 M NaCl, is osmolarity of medium of preliminary cell incubation, not depending on its qualitative composition.

References

1. Aleksandrova D.I., Orlova N.V., Shpakova N.M. Comparative study of preliminary dehydrated human and bovine erythrocyte sensitivity to hypertonic stress// Problems of Cryobiology.– 2007.– Vol. 17, N4.– P. 327–334.
2. Babichuk L.A. Mechanisms of erythrocyte temperature-osmotic stabilization during cooling and freezing at the presence of non-penetrating cryoprotectant: Abstract of Thesis of Doc. Biol. Sci.– Kharkov, 2002.– 299 p.
3. Gorbunov L.V., Morozova I.A., Vaschenko A.V. et al. Temperature of intracellular crystal-formation of carp eggs// Veterynarna biotekhnologiya. Agrarna nauka.– 2004.– N5.– P. 19–23.
4. Denisova O.G. Cryosensibility of erythrocytes of different species of mammals: Abstract of Thesis of Doc. Biol. Sci.– Kharkov, 2006.– 169 p.
5. Zemlyanskikh N.G., Babichuk L.A., Nikolchenko A.Yu. et al. Kinetic characteristics of Ca^{2+} -ATPase of erythrocytes in PEO-1500 presence // Problems of Cryobiology.– 2003.– N4.– P. 28–34.
6. Kuleshova L.G., Rozanov L.F. Study of interaction kinetics of human erythrocytes with cryoprotectants and salts// Kriobiologiya i Kriomeditsina.– 1980.– N7.– P. 40–44.
7. Armstrong J.K., Meiselman H.J., Fisher T.C. Covalent binding of poly(ethylene glycol) (PEG) to the surface of red blood cells inhibits aggregation and reduces low shear blood viscosity // Am. J. Hematol.– 1997.– Vol. 56, N1.– P. 26–28.
8. Balint B., Paunovic D., Vucetic D. et al. Controlled-rate versus uncontrolled-rate freezing as predictors for platelet cryopreservation efficacy // Transfusion.– 2006.– Vol. 46, N2.– P. 230–235.
9. Bogner P., Sipos K., Ludany A. et al. A. Steady-state volumes and metabolism-independent osmotic adaptation in mammalian erythrocytes // Eur. Biophys. J.– 2002.– Vol. 31, N2.– P. 145–152.
10. Cohen C., Dotimas E., Korsgren C. Human erythrocyte membrane protein band 4.2 (pallidin) // Semin. Hematol.– 1993.– Vol. 30, N2.– P. 119–137.
11. Dutheil D., Underhaug G., Petit-Paris I. et al. Polyethylene glycols interact with membrane glycerophospholipids: is this part of their mechanism for hypothermic graft protection // J. Chem. Biol.– 2009.– Vol. 2, N1.– P. 39–49.
12. 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.
13. Kanas T., Acker J.P. Trehalose loading into red blood cells is accompanied with hemoglobin oxidation and membrane lipid peroxidation // Cryobiology.– 2009.– Vol. 58, N2.– P. 232–239.
14. Leach J.K., Hinman A., O'Rear E.A. Investigation of deformability, viscosity, and aggregation of mPEG-modified erythrocytes // Biomed. Sci. Instrum.– 2002.– Vol. 38.– P. 333–338.

4. Денисова О.Г. Криочувствительность эритроцитов разных видов млекопитающих: Дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 2006.– 169 с.
5. Землянских Н.Г., Бабийчук Л.А., Никольченко А.Ю. и др. Кинетические характеристики Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов в присутствии ПЭО-1500 // Пробл. криобиологии.– 2003.– №4.– С. 28–34.
6. Кулешова Л.Г., Розанов Л.Ф. Изучение кинетики взаимодействия эритроцитов человека с криопротекторами и солями // Криобиология и криомедицина.– 1980.– №7.– С. 40–44.
7. Armstrong J.K., Meiselman H.J., Fisher T.C. Covalent binding of poly(ethylene glycol) (PEG) to the surface of red blood cells inhibits aggregation and reduces low shear blood viscosity // Am. J. Hematol.– 1997.– Vol. 56, N1.– P. 26–28.
8. Balint B., Paunovic D., Vucetic D. et al. Controlled-rate versus uncontrolled-rate freezing as predictors for platelet cryopreservation efficacy // Transfusion.– 2006.– Vol. 46, N2.– P. 230–235.
9. Bogner P., Sipos K., Ludany A. et al. A. Steady-state volumes and metabolism-independent osmotic adaptation in mammalian erythrocytes // Eur. Biophys. J.– 2002.– Vol. 31, N2.– P. 145–152.
10. Cohen C., Dotimas E., Korsgren C. Human erythrocyte membrane protein band 4.2 (pallidin) // Semin. Hematol.– 1993.– Vol. 30, N2.– P. 119–137.
11. Dutheil D., Underhaug G., Petit-Paris I. et al. Polyethylene glycols interact with membrane glycerophospholipids: is this part of their mechanism for hypothermic graft protection // J. Chem. Biol.– 2009.– Vol. 2, N1.– P. 39–49.
12. 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.
13. Kaniyas T., Acker J.P. Trehalose loading into red blood cells is accompanied with hemoglobin oxidation and membrane lipid peroxidation // Cryobiology.– 2009.– Vol. 58, N2.– P. 232–239.
14. Leach J.K., Hinman A., O'Rear E.A. Investigation of deformability, viscosity, and aggregation of mPEG-modified erythrocytes // Biomed. Sci. Instrum.– 2002.– Vol. 38.– P. 333–338.
15. Litwa M., Maggs A.M., Jin C.Z. et al. Membrane proteins at the interface of erythrocytes fused by treatment with polyethylene glycol // Mol. Membr. Biol.– 1997.– Vol. 14, N3.– P. 143–148.
16. Mazur P., Cole K.W. Roles of unfrozen fraction, salt concentration, and changes in cell volume in the survival of frozen human erythrocytes // Cryobiology.– 1989. – Vol. 26, N1.– P. 1–29.
17. Money N. P. Osmotic pressure of aqueous polyethylene glycols relationship between molecular weight and vapor pressure deficit // Plant Physiol.– 1989.– Vol. 91, N2.– P. 766–769.
18. Reid C., Rand R.P. Probing protein hydration and conformational states in solution // Biophys. J.– 1997.– Vol. 72, N3.– P. 1022–1030.
15. Litwa M., Maggs A.M., Jin C.Z. et al. Membrane proteins at the interface of erythrocytes fused by treatment with polyethylene glycol // Mol. Membr. Biol.– 1997.– Vol. 14, N3.– P. 143–148.
16. Mazur P., Cole K.W. Roles of unfrozen fraction, salt concentration, and changes in cell volume in the survival of frozen human erythrocytes // Cryobiology.– 1989. – Vol. 26, N1.– P. 1–29.
17. Money N.P. Osmotic pressure of aqueous polyethylene glycols relationship between molecular weight and vapor pressure deficit // Plant Physiol.– 1989.– Vol. 91, N2.– P. 766–769.
18. Reid C., Rand R.P. Probing protein hydration and conformational states in solution // Biophys. J.– 1997.– Vol. 72, N3.– P. 1022–1030.

Accepted in 20.10.2009

*Поступила 20.10.2009
Рецензент Т.П. Линник*