

Эритроциты периферической крови при разных вариантах гипотермии гомойотермного организма

UDC 612.111.014.43:391.128.2

V.V. LOMAKO*, I.F. KOVALENKO, A.V. SHILO

Peripheral Blood Erythrocytes at Various Types of Hypothermia of Homoiothermal Organism

Изучали влияние гипотермии гомойотермного организма на популяционный состав, осмотическую хрупкость и уровень гемолиза эритроцитов периферической крови крыс. Состояния гипотермии достигали разными способами: краниocereбральная гипотермия (до ректальной температуры (РТ) $32,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$) на фоне блокады центров терморегуляции (ЦТ) на специальной установке для программного охлаждения, иммерсионная (погружная) общая гипотермия (ИОГ) (РТ = $27,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$) в модифицированном тесте Порсолта (плавание в ледяной воде) и общая гипотермия методом «закрытого сосуда» Анджуca-Бахметьева-Джайя (ОГЗС) на фоне блокады ЦТ вследствие нарастающей гипоксии-гиперкапнии (РТ = $16,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$). Анализ полученных результатов показал, что независимо от глубины и способа достижения гипотермии гомойотермного организма наблюдаются обратимые, но различные по выраженности изменения: снижается количество дискоцитов, увеличивается доля измененных форм (стоматоцитов и сфероцитов), а также повышается осмотическая хрупкость и усиливается гемолиз эритроцитов. Через 24 ч после гипотермии наблюдается тенденция к повышению количества дискоцитов за счет уплощенных форм, уменьшается доля измененных эритроцитов (стоматоцитов и сфероцитов), осмотическая хрупкость эритроцитов возвращается к контрольному уровню, а при ОГЗС даже снижается, повышается устойчивость клеток к факторам гемолиза, особенно после ИОГ.

Ключевые слова: краниocereбральная гипотермия, общая гипотермия, иммерсионная гипотермия, эритроциты, форма эритроцитов, осмотическая хрупкость, гемолиз.

Вивчали вплив гіпотермії гомойотермного організму на популяційний склад, осмотичну крихкість та рівень гемолізу еритроцитів периферичної крові щурів. Стану гіпотермії досягали різними способами: краниocereбральна гіпотермія (до ректальної температури (РТ) $32,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$) на тлі блокади центрів терморегуляції (ЦТ) на спеціальній установці для програмного охолодження, імерсійна (заглибна) загальна гіпотермія (ІЗГ) (РТ = $27,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$) в модифікованому тесті Порсолта (плавання в крижаній воді) і загальна гіпотермія методом «закритої судини» Анджуca-Бахметьева-Джайя (ЗГЗС) на тлі блокади ЦТ внаслідок наростаючої гіпоксії-гіперкапнії (РТ = $16,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$). Аналіз отриманих результатів показав, що незалежно від глибини і способу досягнення гіпотермії гомойотермного організму спостерігаються зворотні, але відмінні за виразністю зміни: знижується кількість дискоцитів, збільшується частка змінених форм (стоматоцитів і сфероцитів), а також підвищується осмотична крихкість і посилюється гемоліз еритроцитів. Через 24 години після гіпотермії спостерігається тенденція до підвищення кількості дискоцитів за рахунок сплюснених форм, зменшується частка змінених еритроцитів (стоматоцитів і сфероцитів), осмотична крихкість еритроцитів повертається до контрольного рівня, а при ЗГЗС навіть знижується, підвищується стійкість клітин до факторів гемолізу, особливо після ІЗГ.

Ключові слова: краниocereбральна гіпотермія, загальна гіпотермія, імерсійна гіпотермія, еритроцити, форма еритроцитів, осмотична крихкість, гемоліз.

The research deals with effect of hypothermia of homoiothermal organism on populations, osmotic fragility and hemolysis rate in erythrocytes of peripheric blood of rats. The hypothermic state was initiated by different methods: craniocerebral hypothermia (down to rectal temperature (RT) of $32.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$) on a background of blockade of thermoregulation centres (TC) using special device for programmed cooling, whole body immersion hypothermia (WBIH) (RT of $27.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$) using Porsolt's modified test (swimming in ice cold water) and whole body hypothermia by method of closed vessel according Anjus-Bakhmet'ev-Giaja (CVWBH) on a background of TC blockade resulted from increasing level of hypoxia-hypercapnia (RT of $16.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$). Analysis of obtained results showed that independently of depth and the method of initiating hypothermia of homoiothermal organism we observed reversible changes differing by expression rate: the discocytes number decreased, the share of changed shapes increased (stomatocytes and spherocytes); as well as the rise in osmotic fragility and hemolysis level of erythrocytes. In 24 hrs post hypothermia we observed the tendency for rising discocyte content on account of flattened forms, an increase of proportion of changed erythrocyte forms (stomatocytes and spherocytes), the osmotic fragility of erythrocytes turned back to the control level, and after CVWBH it decreased even more, the tolerance of cells to hemolysis factors rised, especially after WBIH.

Key words: craniocerebral hypothermia, general hypothermia, immersion hypothermia, erythrocytes, erythrocytes forms, osmotic fragility, hemolysis.

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+380 57) 372-74-35, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта:
victorial2003@list.ru

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 57 372 7435, fax: +380 57 373 3084, e-mail: victorial2003@list.ru

Проблема биологического действия охлаждения на организм млекопитающих и человека давно является предметом пристального внимания исследователей и к настоящему времени накоплен большой массив данных о его влиянии на функциональную активность различных систем организма. Существует клиническая гипотермия (общая, локальная, краниocereбральная гипотермия (КЦГ) и др.), основное показание к применению которой связано с необходимостью снижения интенсивности обмена веществ во всем организме или в отдельных органах при возникновении угрозы гипоксии, а также для ее предупреждения. Кроме управляемой клинической гипотермии, организм может подвергаться неконтролируемой (случайной), а также гипотермии, применяемой в комплексе с другими факторами, в частности для достижения состояния искусственного гипобиоза. Степень функциональных и метаболических нарушений при гипотермии организма зависит от силы холодового фактора, длительности его воздействия и способа ее достижения.

В поддержании постоянства внутренней среды организма значительная роль принадлежит эритроцитам – наиболее многочисленным форменным элементам крови, которые в норме имеют двояковогнутую форму (дискоциты), что обеспечивает им высокую степень деформируемости и эластичность. Эритроциты – высокоспециализированные транспортные клетки, функциональная активность которых во многом определяет эффективность протекания физиологических процессов. Они также участвуют в иммунных реакциях, процессах свертывания крови, в депонировании, транспорте и метаболизме гормонов и нейромедиаторов, регуляции кислотно-щелочного равновесия и водно-электролитного обмена, в связывании и переносе аминокислот, гепарина, липидов, вирусов, токсинов, лекарственных веществ и др. [13, 17, 25]. Популяция эритроцитов неоднородна по возрасту, форме, размерам и биохимическим параметрам, клетки могут подвергаться разным обратимым и необратимым трансформациям.

Изменение формы эритроцитов является ранним неспецифическим диагностическим индикатором [9] и может быть результатом старения, нарушения внутриклеточного обмена или возникать вследствие эндо- и экзогенных воздействий [17].

Цель работы – изучить влияние различных вариантов гипотермии – КЦГ и общей гипотермии – на соотношение форм, осмотическую хрупкость и гемолиз эритроцитов крови крыс.

Материалы и методы

Работа выполнена на 7–8-месячных самцах белых крыс с соблюдением всех биоэтических

The biological effects resulted from cooling in mammalian and human organism has long been a subject of attention of researchers and a large amount of data have already been accumulated on its effect on the functional activity of the various body systems. The human applies the clinical hypothermia (general, local, craniocerebral hypothermia (CCH), *etc.*), and main indication of its using is associated with the need to reduce the intensity of metabolism in the whole body or particular organs in the cases if hypoxia is highly probable, or to prevent the latter. In addition to controlled clinical hypothermia an organism could undergo the uncontrolled (accidental) one, as well as the hypothermia, applied in combination with other factors, in particular in the case of artificial hypobiosis induction. The degree of functional and metabolic abnormalities under the hypothermia of an organism depends on the strength of cold factor, duration of its impact and the way of its initiation.

Maintenance of constant internal environment of an organism is provided substantially by erythrocytes, being the most abundant elements of blood, which normally are of biconcave shape (discocytes), that facilitates their high deformability and elasticity. Red blood cells are highly specialized transport cells, which functional activity significantly affects the efficiency of physiological processes. They are also involved in immune reactions, blood clotting, transport and metabolism of hormones and neurotransmitters, regulation of acid-base balance and water-electrolytes exchange, in the binding and transport of amino acids, heparin, lipids, viruses, toxins, drugs, *etc.* [13, 17, 25]. Erythrocyte population is heterogeneous by age, shape, size and biochemical parameters, the cells could undergo different reversible and irreversible transformations.

Changes in the shape of red blood cells is an early non-specific diagnostic indicator [9] and may result from aging, or intracellular metabolism disorders as well as occur due to endogenous or exogenous influences [17].

The aim of this research was to examine the effect of different types of hypothermia, *i. e.* CCH and whole body hypothermia, on the proportions of the shapes, osmotic fragility and hemolysis of red blood cells in rats.

Materials and methods

The experiments were performed in 7–8 months old white breedless male rats complying all the bioethical standards for experiments in animals. Craniocerebral hypothermia was done during 60 ± 10 minutes till reaching the rectal temperature (RT) of $32,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ using a special device created in the IPC&C of the National Academy of Sciences of Ukraine, on the background of drug blockade of thermoregulatory centers (TCs) (mixture of sodium thiopental and sodium hydroxybutyrate at 30 and 100 mg per kg of body weight,

норм при работе с экспериментальными животными. КЦГ в течение 60 ± 10 мин до ректальной температуры (РТ) $32,5 \pm 0,5$ °C проводили при помощи специальной установки, созданной в ИПКиК НАН Украины, на фоне наркотической блокады центров терморегуляции (ЦТ) (смесь тиопентала натрия и оксибутирата натрия из расчета 30 и 100 мг/кг массы соответственно). Иммерсионную (погружную) общую гипотермию (ИОГ) (РТ = $27,5 \pm 0,5$ °C) осуществляли в модифицированном тесте «вынужденное плавание» в ледяной воде (0°C) [33], длительность плавания 5 мин. Другой вид общей гипотермии организма достигался методом «закрытого сосуда» Бахметьева-Анджуса-Джайя (ОГЗС) (гипотермия на фоне нарастающей гипоксии-гиперкапнии, т. е. гипоксическо-гиперкапническая блокада ЦТ) в течение 180 ± 30 мин (РТ = $16,5 \pm 0,5$ °C) [15]. Контроль РТ производили электронным термометром.

Сроки исследования: сразу после достижения состояния наркоза, гипотермии и через 24 ч после воздействия. Объем периферической крови для исследования составил 0,3 мл. Контролем служила кровь интактных крыс.

Форма эритроцитов характеризуется поверхностно-объемным соотношением, которое прямо пропорционально индексу сферичности. Методом малоуглового рассеяния света в суспензии эритроцитов (30% гематокрит) определяли их индекс сферичности. Преобладающие формы эритроцитов соответствовали следующим интервалам: 1–1,3 – сфероциты, 1,3–1,7 – стоматоциты, 1,7–2,1 – нормальные и 2,1–3 – уплощенные дискоциты. Для определения уровня осмотической хрупкости (ОХ) и гемолиза эритроцитов в измерительные ячейки, содержащие раствор NaCl (3 мл) разной концентрации, вносили 3 мкл эритроцитарной массы [5, 26].

Статистическую обработку полученных результатов проводили методом Стьюдента-Фишера с использованием программного обеспечения Excel и непараметрической статистики Крускала-Уоллиса.

Результаты и обсуждение

Плотность распределения эритроцитов по индексу сферичности является важной объективной характеристикой крови при патологических процессах и состояниях и используется для оценки влияния на организм различных физических факторов. В норме в крови наблюдается физиологический пойкилоцитоз: количество дискоцитов (нормоцитов) правильной формы, характерной для функционально сохранного эритроцита, составляет $85,05 \pm 1,0\%$, остальные клетки – атипичные, переходные формы (сфероциты, планоциты, эхиноциты, стоматоциты, седловидные и двужмочные эритро-

respectively). Whole body immersion hypothermia (WBIH) (RT of 27.5 ± 0.5 °C) was performed in a modified test of forced swimming in ice cold water (0°C) [33] which lasted 5 minutes. Another type of whole body hypothermia was initiated by the method of closed vessel according Bakhmet'ev-Andjus-Giaja (CVWBH) (hypothermia on the background of increasing level of hypoxia-hypercapnia, *i. e.* hypoxic-hypercapnic blockade of TC) for 180 ± 30 min (RT of 16.5 ± 0.5 °C) [15]. Rectal temperature was monitored by electronic thermometer.

Research terms: after attaining the states of narcosis, hypothermia and 24 hours post exposure. The volume of the peripheral blood samples was 0.3 ml. The blood of intact rats served as control.

The shape of red blood cells is characterized by surface-to-volume ratio, which is proportional to the sphericity index. Using the method of small-angle light scattering by red blood cell suspension (30% hematocrit) we have determined their sphericity index. The predominant shapes of red blood cells conformed the following ranges: 1–1.3 – spherocytes, 1.3–1.7 – stomatocytes, 1.7–2.1 normal and 2.1–3 – flattened discocytes. To determine the level of osmotic fragility and hemolysis of red blood cells the erithromass of 3 µl volume was introduced into measuring cuvettes with NaCl solution (3 ml) of various concentrations [5, 26].

Statistical processing of the results was performed by the Student-Fisher's test using Excel software as well as nonparametric Kruskal-Wallis test.

Results and discussion

The density of distribution for erythrocyte sphericity index is an important objective characteristic of blood under pathological processes and conditions, and is used to assess the effects of various physical factors on the organism. Normally, the blood has the physiological poikilocytosis: portion of discocytes (normocytes) of proper shape, characteristic for intact functional erythrocyte, is $85.05 \pm 1.0\%$, the remaining cells: atypical, modified forms (spherocytes, planocytes, echinocytes, stomatocytes, saddle-shaped erythrocytes and other), amount in average $12.86 \pm 0.38\%$ [9, 13]. Violations of erythropoiesis, changes in electrolyte balance and concentration of metabolites in blood *etc.* result in reversible (echinocytes and stomatocytes) and irreversible (spherocytes, elliptocytes, codocytes) modifications of cell shape. These forms of red blood cells may also appear as transient ones during aging [17, 25].

Craniocerebral hypothermia is a method of therapeutic hypothermia and is performed together with drug blockade of TCs. Drugs for total anesthesia affect the normal thermoregulatory processes by reducing the basic metabolism, inhibition of vasoconstriction, inhibition of shivering thermogenesis and suppression of hypothalamic regulatory centers.

циты) – в среднем $12,86 \pm 0,38\%$ [9, 13]. Нарушения эритропоэза, изменения электролитного баланса крови, концентрации метаболитов и др. приводят к появлению обратимо (эхиноциты и стоматоциты) и необратимо (сфероциты, эллиптоциты, кодоциты) измененных форм клеток. Эти формы эритроцитов также могут появляться как переходные в процессе старения [17, 25].

Краниocereбральная гипотермия является одним из методов лечебной гипотермии и проводится на фоне наркотической блокады ЦТ. Препараты для общей анестезии влияют на процессы нормальной терморегуляции путем снижения уровня основного метаболизма, угнетения вазоконстрикции, выключения сократительного термогенеза и подавления гипоталамических регулирующих центров.

В наших экспериментах погружение в наркоз сопровождалось увеличением доли сфероцитов в крови крыс, но количество нормальных форм эритроцитов достоверно не менялось (табл. 1). Гипотермия организма способствовала значительному уменьшению количества дискоцитов: при ИОГ – почти на 20%, но особенно резко при ОГЗС и КЦГ, когда охлаждение происходило на фоне блокады ЦТ. Наблюдался также рост числа стоматоцитов (при ОГЗС почти в 1,5 раза, при ИОГ – более чем на 20%) и сфероцитов (при КЦГ и ОГЗС). Через 24 ч после достижения гипотермии соотношение форм эритроцитов возвращалось к контрольному уровню, кроме сфероцитов, доля которых оставалась повышенной, особенно после КЦГ. Следует отметить, что спустя 24 ч после гипотермии наблюдается тенденция к увеличению доли уплощенных форм дискоцитов (табл. 1).

Таким образом, гипотермия гомойотермного организма сопровождается существенным снижением доли дискоцитов и ростом количества измененных форм эритроцитов (стомато- и сфероцитов).

В крови эритроциты в норме находятся в изотоническом растворе и более других клеток чувствительны к осмотическому шоку. Какое-либо отклонение их формы от дискоцита вследствие снижения эластичности и деформируемости, а также увеличения размеров клетки способствует гемолизу эритроцитов. В норме гемолиз наименее устойчивых эритроцитов *in vitro* начинается при 0,44%-й концентрации NaCl (0,46–0,42%), полный гемолиз – при 0,32%-й (0,34–0,30%).

In our experiments, the narcotization was accompanied with an increased proportion of spherocytes in the blood of rats, but the number of red blood cells with normal shape was not significantly changed (Table 1). Body hypothermia contributed to a significant reduction in the number of discocytes: at WBIH it did by almost 20%, but very abrupt it was at CVWBH and CCH when cooling took place together with the TC blockade. We observed also the rise in number of stomatocytes (for CVWBH it was 1.5 times and by more than 20% at WBIH) and spherocytes (at CCH and WBIH). In 24 hrs after initiating the hypothermia the ratio between erythrocyte forms returned to the control level, except spherocytes, whose part remained high, especially after the CCH. It should be noted that after 24 hrs of hypothermia there was the tendency for increase of discocyte flattened forms content (Table 1).

Таблица 1. Влияние различных видов гипотермии на соотношение преобладающих форм эритроцитов в периферической крови крыс

Table 1. Effect of various types of hypothermia on the ratio of predominant forms of erythrocytes in rat peripheral blood

Условия эксперимента Conditions	Индекс сферичности Sphericity index			
	1–1,3	1,3–1,7	1,7–2,1	2,1–3
	сфероциты spherocytes	стоматоциты stomatocytes	дискоциты discocytes	
нормальные normal			уплощенные flattened	
Контроль Control	1,24 ± 0,89	40,82 ± 3,78	52,79 ± 3,07	5,14 ± 2,04
Наркоз Narcosis	5,07 ± 2,27*	40,9 ± 6,63	48,03 ± 9,17	6,0 ± 2,05
КЦГ CCH	3,22 ± 0,1*	66,06 ± 1,75*	28,29 ± 1,4*	2,44 ± 0,25*
Через 24 ч КЦГ 24 hrs post CCH	8,35 ± 6,21*	39,16 ± 6,81	45,65 ± 5,58	6,84 ± 4,05
ИОГ WBIH	2,90 ± 1,35	57,40 ± 4,14*	34,47 ± 3,01*	5,27 ± 1,27
Через 24 ч после ИОГ 24 hrs post WBIH	3,57 ± 1,19	31,83 ± 0,66*	56,60 ± 1,37*	8,00 ± 1,18*
ОГЗС CVWBH	7,48 ± 5,52	70,22 ± 13,06*	19,56 ± 10,11*	2,72 ± 0,99
Через 24 ч после ОГЗС 24 hrs post CVWBH	3,27 ± 1,63	37,2 ± 4,31	48,7 ± 2,78	8,03 ± 5,08

Примечание: * – изменения статистически значимы по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

Note: * – the changes are statistically significant if compared with the control, $p < 0.05$.

Возраст и форма эритроцитов определяют их осмотическую хрупкость, которая зависит от структурно-функциональных свойств мембраны и служит одним из критериев оценки ее сохранности. Уровень осмотической хрупкости эритроцитов принято считать величиной, численно равной концентрации NaCl, когда происходит гемолиз 50% клеток.

Применяемый наркоз не оказывал выраженного влияния на осмотическую хрупкость эритроцитов: при достижении гипотермии она увеличивалась (с 0,46 до 0,5% NaCl), эритроциты становились более хрупкими (рис. 1–3), особенно при ОГЗС (0,53% NaCl); усиливался гемолиз, но начало его сдвигалось к концентрации NaCl 0,6% при КЦГ и 0,7% при иммерсионной гипотермии (табл. 2). Через 24 ч после КЦГ и ИОГ уровень осмотической хрупкости возвращался к контрольному, а после ОГЗС он даже уменьшался; гемолиз эритроцитов оставался на прежнем уровне после КЦГ, но при обоих вариантах общей гипотермии заметно снижался (рис. 1–3, табл. 2).

Таким образом, гипотермия гомойотермного организма способствует повышению осмотической хрупкости и усилению гемолиза эритроцитов. Через 24 ч уровень осмотической хрупкости эритроцитов возвращается к исходному и даже снижается, особенно после ОГЗС, они становятся более устойчивыми к гемолизу, особенно при обоих

Thus, hypothermia of homoiothermal organism is accompanied by a significant decrease in the portion of diskocytes and the rise in the number of modified forms of erythrocytes (stomato- and spherocytes).

In the blood, red blood cells are normally in isotonic environment and are more sensitive to osmotic shock comparing to other cells. Any deviation in their shape from discocyte due to decreased elasticity and/or deformability, as well as due to increased cell size results in hemolysis. Normally, the hemolysis of the least stable erythrocytes starts *in vitro* at 0.44% concentration of NaCl (0.46–0.42%), complete hemolysis occurs at 0.32% (0.34–0.30%). The age and shape of red blood cells determine their osmotic fragility, which depends on the structure and function of the membrane and is one of the criteria for assessing its integrity. Level of osmotic fragility of erythrocytes is conditionally taken as a value numerically equal to the concentration of NaCl, at which the 50% hemolysis occurs.

The applied narcosis had no pronounced effect on the osmotic fragility of red blood cells: after initiating hypothermia it increased (from 0.46 to 0.5% NaCl), red blood cells become more fragile (Figure 1–3), especially at the CVWBH (0.53% NaCl); the hemolysis strengthened, but its beginning shifted to the NaCl concentration of 0.6% at CCH and 0.7% for immersion hypothermia (Table 2). 24 hours after the CCH and WBIH the osmotic fragility level returned to the control, and after CVWBH it even decreased more, the

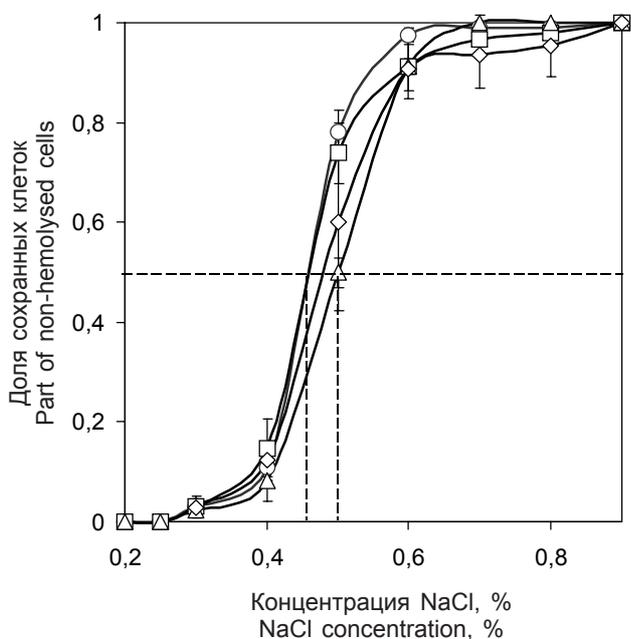


Рис. 1. Осмотическая хрупкость эритроцитов крыс после КЦГ: ○ – контроль; □ – наркоз; △ – КЦГ; ◇ – 24 ч после КЦГ.

Fig. 1. Osmotic fragility of rat erythrocytes after CCH: ○ – control; □ – narcosis; △ – CCH; ◇ – 24 hrs post CCH.

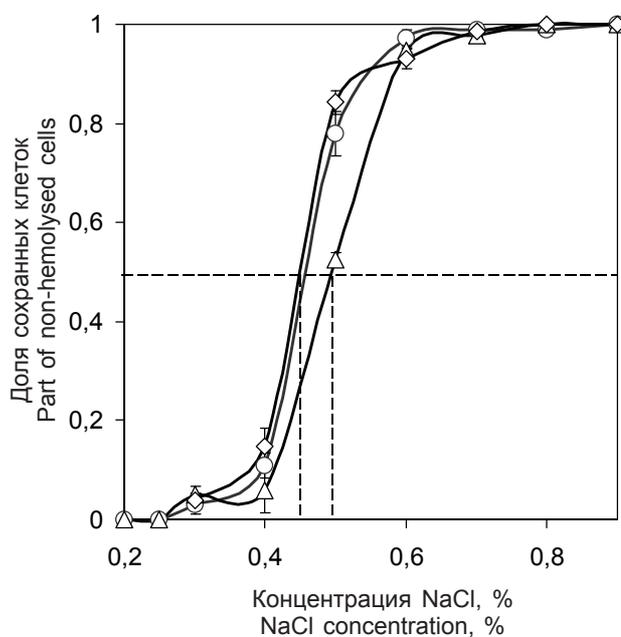


Рис. 2. Осмотическая хрупкость эритроцитов крыс после ИОГ: ○ – контроль; △ – ИОГ; ◇ – 24 ч после ИОГ.

Fig. 2. Osmotic fragility of rat erythrocytes after WBIH: ○ – control; △ – WBIH; ◇ – 24 hrs post WBIH.

вариантах общей гипотермии (рис. 1–3, табл. 2), возможно, за счет увеличения доли уплощенных дискоцитов (см. табл. 1), являющихся наиболее стойкой к факторам гемолиза форме эритроцита. Следует отметить, что иммерсионная гипотермия оказывает менее выраженное воздействие на эритроциты крови крыс. Вероятно, применяемая нами наркотическая и развивающаяся гипоксическо-гиперкапническая блокада ЦТ играет свою далеко не позитивную роль и 24 ч – недостаточный срок для восстановления изучаемых показателей. Можно предположить, что это обусловлено активацией на фоне блокады ЦТ процессов несократительного термогенеза, в которых, по заключению Н.Г. Петраковича [18], эритроциты играют определенную роль и являются одним из источников термогенеза, благодаря особенностям строения, содержанию большого количества липидов в мембране и железа (металла переменной валентности). Кроме того, M.L. Mallet показал [32], что при снижении РТ на каждые 8°C продукция CO₂ падает на 50%; при снижении РТ на каждый 1°C рН артериальной крови повышается на 0,015 Ед, метаболическая потребность тканей мозга в O₂ снижается на 7%, гематокрит увеличивается на 2%. Изменение концентрации водородных ионов на 1 мЭкв/л приводит к изменению рН на 0,01. Сравнимые же нами варианты охлаждения имеют принципиальные отличия по характеру воздействия на зону размещения холодовых рецепторов, длительности сеанса (5, 60 ± 10 и 180 ± 30 мин), степени снижения РТ (32,5 ± 0,5, 27,5 ± 0,5 и 16,5 ± 0,5°C) и сочетанию других факторов (с блокадой ЦТ и без нее, наркоз, гипоксия-гиперкапния, иммерсия).

Известно, что гипоксия активирует эритропоэз. Клетки перитубулярного аппарата почек при снижении содержания кислорода в крови синтезируют эритропоэтин. При этом эритроцит чрезвычайно устойчив к недостатку кислорода, его энергетический метаболизм восстанавливается за счет гликолиза и пентозного пути окисления глюкозы. Одной из наиболее изученных сигнальных молекул, активирующихся в условиях гипоксии, является аденозин, при этом он в основном проявляет цитопротекторное действие; в ответ на его сигнал в клетках развиваются приспособительные реакции [31]. Недавние исследования показали, что именно повышение функциональной активности аденозина, опосредованное гипоксией, играет важную роль в нормальной физиологии эритроцитов [36].

Изменение формы эритроцитов может быть энергетически зависимым процессом. В свою очередь, эффект АТФ, как и аденозина, опосредован Ca²⁺ [30], но имеет выраженную температурную

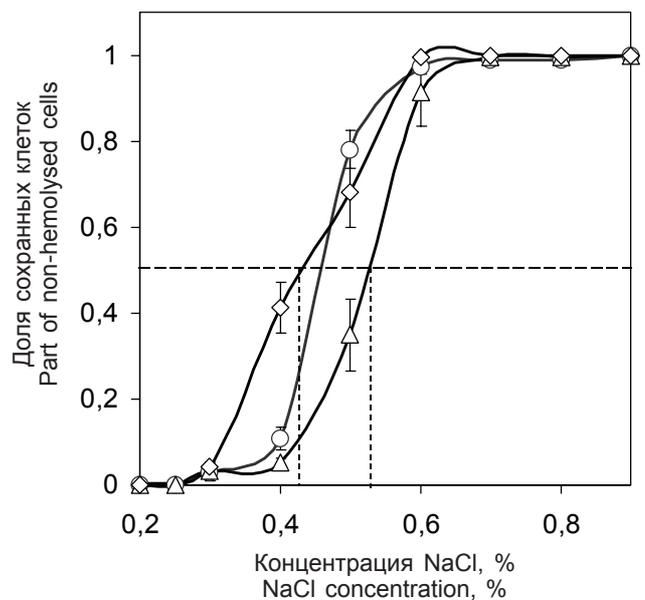


Рис. 3. Осмотическая хрупкость эритроцитов крыс после ОГЗС: ○ – контроль; △ – ОГЗС; ◇ – 24 ч после ОГЗС.

Fig. 3. Osmotic fragility of rat erythrocytes after CVWBH: ○ – control; △ – CVWBH; ◇ – 24 hrs post CVWBH.

hemolysis remained stable after the CCH, but after both versions of the whole body hypothermia it reduced significantly (Fig. 1–3, Tab. 2).

Thus, hypothermia of homoiothermal organism promotes the increase in osmotic fragility and hemolysis of red blood cells. After 24 hours, the osmotic fragility of red blood cells returns back to the control level and even lower, especially after CVWBH, the cells become more resistant to hemolysis (especially after both variants of whole body hypothermia) (Fig. 1–3, Table 2). It occurs probably due to increase in flattened discocytes content (see Table 1), which are the most resistant to hemolysis among the erythrocyte forms. It should be noted that the immersion hypothermia has the less pronounced effect on red blood cells of rats. Probably the used by us drug blockade and the occurring hypoxic-hypercapnic blockade of TCs acted far from positive, and 24 hours was not an adequate period to restore the studied parameters. One can assume that this was due to the activation of nonshivering thermogenesis on a background of TCs blockade, where, in the opinion of N.G. Petrakovich [18], red blood cells are one of the sources of thermogenesis, due to their special structure, the large content of lipids in the membrane as well as the iron (a variable valence metal). In addition, M.L. Mallet has shown [32] that the reduction in RT for each 8 degrees led to 50% fall in CO₂ production; and fall in RT by each 1 degree resulted in increase of arterial blood pH by 0,015 Units, reduction of the me-tabolic demand of the brain tissue

Таблица 2. Влияние различных видов гипотермии на уровень гемолиза эритроцитов в периферической крови крыс
Table 2. Effect of various types of hypothermia on the hemolysis rate of erythrocytes of rat peripheral blood

Концентрация NaCl, % NaCl concentration, %	Уровень гемолиза, % Hemolysis rate, %							
	Контроль Control	Наркоз Narcosis	КЦГ ССН	Через 24 ч после КЦГ 24 hrs post ССН	ИОГ WBH	Через 24 ч после ИОГ 24 hrs post WBH	ОГЭС CVWBH	Через 24 ч после ОГЭС 24 hrs post CVWBH
0,9	0	0	0	0 ± 0	0	0	0	0
0,8	1,13 ± 1,13	2,13 ± 2,13	0	4,02 ± 4,02	0	0	0,5 ± 0,5	0
0,7	1,13 ± 1,13	3,35 ± 2,55	0	5,12 ± 5,12	2,27 ± 1,51	1,08 ± 1,08	0,5 ± 0,5	0
0,6	2,73 ± 1,43	8,75 ± 4,40*	8,70 ± 0,40*	8,78 ± 4,83	5,27 ± 1,49	6,99 ± 2,53	8,70 ± 7,70	0,63 ± 0,63
0,5	22,0 ± 3,80	26,15 ± 11,45	55,10 ± 3,33*	43,88 ± 15,65*	47,50 ± 2,73*	15,07 ± 2,66*	65,15 ± 13,25	31,82 ± 20,51
0,4	89,1 ± 2,50	85,20 ± 5,55	91,67 ± 4,04	91,56 ± 2,45	94,17 ± 0,64	87,48 ± 2,68	94,95 ± 1,15	59,68 ± 38,11
0,3	96,95 ± 2,05	97,00 ± 0,60	97,71 ± 1,68	96,99 ± 0,62	95,10 ± 1,27	95,18 ± 0,05	96,85 ± 0,05	95,9 ± 4,10

Примечание: * – изменения статистически значимы по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

Note: * – the changes are statistically significant if compared with the control, $p < 0.05$.

зависимость – гипотермия значительно усиливает действие АТФ [37]. Уменьшение концентрации АТФ вызывает повышение чувствительности эритроцитов к трансформирующим агентам: непроницающие анионы, катионные амфифилы, альбумины способствуют стоматоцитарной трансформации. При гипо- и гипертермии, физических нагрузках уровень альбумина повышается. Вероятно, при гипотермии, вследствие усиления функциональной активности АТФ [37], чувствительность эритроцитов к трансформирующим агентам может снижаться.

Способность эритроцитов взаимодействовать с веществами сыворотки крови, транспортировать их, вызывая регуляторные эффекты, зависит от состояния фосфолипидных компонентов мембраны, ее поверхностных и интегральных белков. В свою очередь, это состояние определяется интенсивностью энергообеспечивающих реакций и соотношением активности про- и антиоксидантных процессов [19]. В отличие от нормальных физиологических условий, когда метаболические процессы стабилизированы гомеостатическими механизмами, при различных стрессах и патологических состояниях функциональная активность эритроцитов усиливается. В частности, при остром холодном стрессе это обусловлено индукцией резкого гормонального сдвига, приводящего к повышению в сыворотке крови концентрации триглицеридов, холестерина и др. В то же время при охлаждении могут существенно повышаться количество связанных с эритроцитарной мембраной биоактивных веществ, меняться свойства самой мембраны. Такие

изменения в O_2 by 7%, and rise in hematocrit by 2%. Change in the concentration of hydrogen ions by 1 mEq per litre resulted in a change of pH by 0.01. The compared by us cooling regimens possess the fundamental differences by the impact on the cold receptor zones, the duration of session (5; 60 ± 10 and 180 ± 30 min), the level of RT reduction (32.5 ± 0.5; 27.5 ± 0, 5 and 16.5 ± 0,5°C) and by combination of other factors (with or without the TC blockade, narcosis, hypoxia-hypercapnia, immersion).

It is known that hypoxia activates erythropoiesis. Cells of kidneys peritubular apparatus synthesize erythropoietin if the oxygen content in blood reduces. Moreover the erythrocyte is extremely resistant to the lack of oxygen, its energy metabolism is restored due to glycolysis and the pentose phosphate pathway of glucose oxidation. One of the most studied signaling molecules activated under hypoxic conditions is adenosine, moreover it manifests mainly cytoprotective action: in response to its presence an adaptive response is developed in cells [31]. Recent studies have shown that namely the increased functional activity of adenosine triggered by hypoxia contribute significantly to normal physiology of red blood cells [36].

Changes in the shape of red blood cells may be an energy-dependent process. In its turn, the effect of ATP, as well as of adenosine, is mediated by Ca^{2+} [30], but has a pronounced temperature dependence: hypothermia significantly enhances the effect of ATP [37]. Reducing the concentration of ATP results in increased sensitivity of red blood cells to transforming agents: non-penetrating anions, cationic amphiphiles, and albumins contribute to stomatocyte transformation. Under

перестройки способствуют повышению чувствительности эритроцитов к лекарственным препаратам, нормализующим энергетический и антиоксидантный статус клеток, а также модифицирующим рецепторный аппарат мембраны [10]. Вероятно, этим в определенной степени может объясняться отмечаемое при гипотермии и после ее сеансов значительное снижение эффективных доз некоторых лекарственных средств.

При гипотермии независимо от ее глубины в эритроцитах интенсифицируются процессы ПОЛ [22]. При усилении ПОЛ в липидном бислое мембран эритроцитов появляются гидрофильные кластеры (явление «водной коррозии» мембран) [2], что приводит к повышенной гидратации мембраны. В условиях КЦГ в мембране эритроцита понижается содержание фосфолипидов, холестерина, АТФ, магния и повышается концентрация кальция, что является одной из причин изменения формы эритроцитов, при углублении гипотермии в циркулирующей крови появляются эхиноциты [12].

Известно, что форма эритроцитов также зависит от состояния их цитоскелет-мембранного комплекса. Белок полосы 3 составляет до 10% общей площади мембраны, чувствителен к изменению рН и концентрации анионов [37], его конформационные изменения могут вызывать значительные изменения формы эритроцита [28, 29]. Появление сфероцитов связывают с изменением состояния спектрина вследствие его агрегации, вызванной кальцием [8]. Колебания в соотношении нормальных и измененных форм эритроцитов при гипотермии могут быть связаны с изменениями взаимодействия цитоскелетных белков между собой и другими компонентами мембраны.

Форма эритроцита изменяется под действием простагландинов (ПГ): ПГ E1 увеличивает пластичность эритроцитов, а ПГ E2 уменьшает ее и усиливает ригидность [34]. Под влиянием ПГ E1 увеличивается синтез цАМФ, что способствует повышению деформируемости эритроцитов. КЦГ значительно модифицирует обмен и высвобождение ПГ, приводя к преимущественному накоплению ПГ E [14].

Деформируемость эритроцитов регулируется и является важнейшим фактором, определяющим текучесть крови, высокочувствительным к изменениям практически любого метаболического процесса в клетке и организме [8]. В условиях гипоксии она снижается, происходят изменения связанных с ней показателей кислородтранспортной функции крови, процессов ПОЛ и антиоксидантной системы, что позволяет рассматривать деформируемость эритроцитов как интегральный критерий не только тяжести нарушений кислородного обеспечения, но и прооксидантно-антиоксидантного состояния организма [8].

hypo- and hyperthermia, physical exercises the albumin level increases. Probably under hypothermia the sensitivity of erythrocytes to transforming agents may decrease due to increased functional activity of ATP [37].

The ability of red blood cells interact with substances of blood serum, to transport them, causing regulatory effects, depends on the state of membrane phospholipid components, superficial and integral proteins. In its turn, this state is determined by the intensity of energy supply reactions and pro-/antioxidant activity ratio [19]. In contrast to the normal physiological conditions when metabolic processes are stabilized by homeostatic mechanisms, different stress and pathological conditions are accompanied by increased functional activity of red blood cells. In particular, the acute cold stress provokes the induction of abrupt hormonal shift, which results in increased concentrations of triglycerides, cholesterol, *etc* in serum. At the same time, cooling can be accompanied with significant increase of amount of bioactive substances bounded with red blood cell membrane as well as with changes in the properties of the membrane itself. These re-arrangements contribute to increase of red blood cells sensitivity to drugs, that normalize the energetic and antioxidant status of the cells, as well as modify the membrane receptor system [10]. This probably can fairly explain the noted during hypothermia and after its course significant reduction of effective doses of certain drugs.

Under hypothermia, regardless of its depth, the intensity of lipid peroxidation in erythrocytes rises [22]. This results in appearance of hydrophilic clusters in lipid bilayer of red blood cell membrane (the phenomenon of membrane's 'water corrosion') [2], which leads to increased hydration of the membrane. Under the CCH the content of phospholipids, cholesterol, ATP, magnesium in erythrocyte membrane decreases and increases the concentration of calcium, which is one of the reasons of changes in shape of red blood cells: echinocytes appear in the circulating blood with the deepening of hypothermia [12].

The shape of red blood cells is also known to depend on the state of their cytoskeleton-membrane complex. Band 3 protein makes up to 10% of the total area of the membrane and is sensitive to changes in pH and the concentration of anions [37], its conformational changes can cause significant changes in the shape of erythrocyte [28, 29]. The appearance of spherocytes is associated with changes in the state of spectrin due to its calcium induced aggregation [8]. Fluctuations in the ratio of normal and altered forms of red blood cells under hypothermia may be associated with changed interactions of cytoskeletal proteins with themselves and other components of the membrane too.

Erythrocyte shape changes under the action of prostaglandins (PG): PG E1 increases the flexibility of red blood cells, and PG E2 decreases the latter and increases the rigidity [34]. Presence of PG E1 increases

При всем многообразии патологических процессов и состояний изменения ультраструктуры эритроцитов имеют универсальный характер [9, 21]. При патологии в клетке происходят определенные изменения (их число ограничено) морфофункциональных признаков и общих механизмов [24], ведущих к дестабилизации и деструкции мембран. Вследствие этого происходят нарушения метаболизма клетки, в частности дефицит продукции энергии, интенсификация процессов свободнорадикального окисления, сдвиг внутриклеточного кальциевого баланса [11].

Кроме того, при патологии возрастает полиморфизм популяции эритроцитов (увеличение количества эритроцитов с измененной формой) [23], наблюдаются выраженное уменьшение числа дискоцитов и увеличение количества переходных, предгемолитических, дегенеративных и необратимых форм клеток, что коррелирует с тяжестью заболевания [16]. Гетерогенные популяции эритроцитов (дискоциты, эхиноциты и стоматоциты) более чувствительны к действию осмотического фактора, pH и гипотермии [20].

В наших экспериментах через 24 ч после гипотермии гомеотермного организма (крысы) наблюдается тенденция к повышению доли дискоцитов (за счет уплощенных форм, являющихся более стойкими к факторам гемолиза). Снижается уровень измененных форм эритроцитов (стоматоцитов и сфероцитов), повышается устойчивость клеток к факторам гемолиза, особенно после ИОГ, уменьшается осмотическая хрупкость эритроцитов, наиболее выражено после ОГЗС (табл. 1–2, рис. 1–3). Это может свидетельствовать о качественном улучшении популяционного состава эритроцитов периферической крови крыс благодаря наблюдаемой нами тенденции к ее гомогенности. Возможно, в отдаленные сроки после гипотермии такая тенденция будет усиливаться.

Эти изменения, по-видимому, имеют адаптивную направленность и могут отражать специфичность ответной реакции эритроцитов на охлаждение гомеотермного организма (гипотермию). Наше предположение согласуется с данными, полученными *in vitro* и свидетельствующими о температурозависимых изменениях состояния мембран эритроцитов, отражающихся на их форме, наиболее существенные наблюдались в диапазоне температур 15...8 °С [7]. Показано, что именно в этой области низких (выше 0°С) температур происходят самые масштабные перестройки мембран эритроцитов [4, 6]. Эквilibрация эритроцитов с криопротектором при 0°С, в отличие от 22°С, способствует сохранению и стабилизации их формы и пространственной структуры мембранных белков

the synthesis of cAMP, which raise red blood cell deformability. CCH significantly modifies the exchange and release of PGs, resulting in predominant accumulation of PG E [14].

The deformability of red blood cells can be triggered and is the most important factor determining the fluidity of blood, being highly sensitive to changes in almost every metabolic process in the cell and the organism [8]. Under hypoxic conditions, it is reduced, there appear the changes of related indices of oxygen transport function of blood, lipid peroxidation and antioxidant system, which allows to consider the deformability of red blood cells as an integral criterion both of the severity of violations in oxygen supply, and of pro/antioxidant balance of an organism as well [8].

With all the variety of pathological processes and state the changes in the ultrastructure of red blood cells are of universal character [9, 21]. Under any pathology there are certain changes (their number is limited) of morphofunctional characteristics and general mechanisms in the cell [24], which lead to the disturbing and destruction of membranes. This results in the cell metabolic derangements, in particular, lack of energy production, intensification of free radical oxidation, and intracellular calcium disbalance [11].

In addition, a pathology is accompanied by increased polymorphism of erythrocyte population (increased number of red blood cells with a modified shape) [23], resulted in significant reduction in the number of discocytes and increasing the number of transitional, prehemolytic, degenerative and irreversible forms of cells, which correlates with the severity of disease [16]. Heterogeneous populations of red blood cells (discocytes, echinocytes and stomatocytes) are more sensitive to osmotic factors, pH and hypothermia [20].

Our experiments revealed 24 hours post hypothermia of homoiothermal organism (rat) the tendency of increasing the proportion of discocytes (on account of flattened forms being more resistant to the factors of hemolysis). The content of modified forms of erythrocytes (stomatocytes and spherocytes) decreased, the resistance of cells to hemolysis factors increased, especially after the WBIH, the osmotic fragility of red blood cells decreased (most pronounced after CVWBH) (Table 1–2, Fig. 1–3). This may indicate a qualitative improvement in population composition of peripheral blood erythrocytes in rats due to observed trend towards its homogeneity. In the long-term period after hypothermia this trend will probably intensify.

These changes appear to have adaptive directionality, and may reflect the specificity of the response of red blood cells to cooling of homoiothermal organism (hypothermia). Our supposition conforms with the data obtained *in vitro* and testifying the temperature dependent changes in red blood cell membrane state, which

на близком к нативному уровню и при последующем замораживании-отогреве [1].

Учитывая, что значительное число патологических процессов инициируется или сопровождается повреждением клеточных мембран и их структур [3], и, рассматривая трансформацию циркулирующих эритроцитов как результат структурно-метаболической перестройки их мембран [26], можно предположить следующее. Отмеченные нами особенности реакции эритроцитов на снижение температуры тела (гипотермию организма) могут в значительной степени определять эффективность лечебных сеансов гипотермии. Гипотермия, снижая проницаемость клеточной мембраны [1, 21, 22, 26, 32], способствует предотвращению каскада реакций, компенсирующих дефицит кислорода, помогая свести к минимуму нарушения внутриклеточной среды.

Выводы

Таким образом, независимо от глубины и способа достижения гипотермии гомеотермного организма – краниocereбральная гипотермия (RT = 32°C), общая иммерсионная гипотермия (RT = 27°C) и общая гипотермия на фоне нарастания гипоксии-гиперкапнии (RT = 17°C) – наблюдается обратимое, но различное по выраженности изменение соотношения форм эритроцитов: снижается количество дискоцитов, увеличивается доля измененных форм (стоматоцитов и сфероцитов), а также повышается осмотическая хрупкость и усиливается гемолиз эритроцитов.

Через 24 ч после гипотермии наблюдается тенденция к увеличению количества дискоцитов за счет уплощенных форм, доля измененных форм эритроцитов (стоматоцитов и сфероцитов) снижается, осмотическая хрупкость эритроцитов возвращается к контрольному уровню, а при общей гипотермии на фоне гипоксии-гиперкапнии даже снижается, повышается устойчивость клеток к факторам гемолиза, особенно после иммерсионной общей гипотермии.

Литература

1. Бабийчук Л.А., Землянских Н.Г. Влияние полиэтиленоксида-1500 и температуры на особенности модификации мембран эритроцитов // Проблемы криобиологии. – 1996. – №4. – С. 32–38.
2. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты // Вестник РАМН. – 1998. – №7. – С. 43–51.
3. Геннис Р. Биомембраны: молекулярная структура и функции. – М.: Мир, 1997. – 624 с.
4. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – Киев: Наук. думка, 1994. – 143 с.

affect their shape, and the most significant ones were observed within the temperatures of 15...8°C [7]. It was shown, that namely within this interval of low (but higher than 0°C) temperatures, the most significant re-arrangements in erythrocyte membrane occur [4, 6]. Erythrocytes exposure with cryoprotectant at 0°C unlike 22°C contribute to preservation and stabilization of their shape and spatial structure of membrane proteins maximally close to the native state after following freeze-thawing [1].

Keeping in mind the most pathological processes as initiated and accompanied by disturbances of cell membranes and structures [3], and considering the transformation of circulating erythrocytes as a result of re-arrangement in structure and metabolism of their membrane [26] the following supposition could be made. The revealed by us peculiarities in erythrocytes' reaction to decrease of body temperature (hypothermia of an organism) could substantially determine the efficiency of hypothermic therapy. Hypothermia decreases the permeability of cell membrane [1, 21, 22, 26, 32] and thereby enables to prevent the cascade of reactions, compensating the oxygen deficit, and promoting to minimize the intracellular media violations.

Conclusions

Thus independently on the depth and way of initiating the hypothermia of homoiothermal organism (cranio-cerebral hypothermia, RT of 32°C; whole body immersion hypothermia, RT of 27°C; and whole body hypothermia on the background of increasing level of hypoxia-hypercapnia, RT of 17°C) we observed the changes in erythrocyte forms proportions that were reversible but differing by expression level: the content of discocytes decreased, the part of changed shapes increased (stomatocytes and spherocytes); as well as the rise in osmotic fragility and hemolysis level of erythrocytes.

In 24 hrs post hypothermia we observed the tendency for rising discocyte content on account of flattened forms, the part of changed erythrocyte forms (stomatocytes and spherocytes) decreased, the osmotic fragility of erythrocytes turned back to the control level, and after whole body hypothermia together with hypoxia-hypercapnia it decreased even more, the tolerance of cells to hemolysis factors rised, especially after whole body immersion hypothermia.

References

1. Babiychuk L.A., Zemlyanskikh N.G. The effect of polyethylene oxide-1500 and temperature on the peculiarities of the RBC membrane modification // Problems of Cryobiology. – 1996. – N4. – P. 32–38.

5. *Гордієнко Є.О., Гордієнко О.І., Коваленко І.Ф. та ін.* Фізико-математичний аналіз та експериментальне визначення щільності розподілу еритроцитів донорської і пуповинної крові людини за індексом сферичності // *Біофіз. вісник.* – 2000. – Вип. 1(6). – С. 75–78.
6. *Гордієнко О.І.* Вплив температури на проникність мембран еритроцитів людини для 1,2-пропандіолу та диметилсульфоксиду // *Проблемы криобиологии.* – 2003. – №1. – С. 38–45.
7. *Давыдова Е.В., Гордиенко О.И.* Влияние температуры на распределение эритроцитов по индексу сферичности // *Біофіз. вісник.* – 2009. – Вип. 2(23). – С. 114–119.
8. *Зинчук В.В.* Дифференцируемость эритроцитов: физиологические аспекты // *Успехи физиол. наук.* – 2001. – Т. 32, №3. – С. 66–77.
9. *Кизилова Н.Н., Тишко Т.В., Тишко Д.В.* Анализ формы эритроцитов с помощью цифровой голографической интерференционной микроскопии // III Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии «Медицинская физика – 2010». – М., 2010. – С. 260–262.
10. *Котельникова Л.В.* Метаболический статус эритроцитов и его коррекция стабилизаторами клеточных мембран при нарушении энергетического гомеостаза: Автореф. дис. ... канд.биол. наук. – Курск, 2000. – 24 с.
11. *Крыжановский Г.Н.* Дисрегуляционная патология. – М.: Медицина, 2002. – 630 с.
12. *Ловкова Т.А.* Особенности обмена липидов при крианиоцеребральной гипотермии // *Актуальные вопросы здоровья населения центра России.* Сб. науч. трудов. – Рязань, 2002.– Вип. 3.– С. 43–45.
13. *Луговская С.А., Козинец Г.И.* Иерархия гемопозитических клеток: кинетика, структура и функции // *Клин. лабораторная диагностика.* – 2009. – №5. – С. 21–37.
14. *Малая Л.Т., Бабичук Г.А., Власенко М.А., Чижевская И.В.* Содержание простагландинов в крови животных с экспериментальным инфарктом миокарда при крианиоцеребральной гипотермии // *Криобиология.* – 1986. – №2. – С. 3–6.
15. *Мельничук С.Д., Мельничук Д.О.* Гіпобіоз тварин (молекулярні механізми та практичне значення для сільського господарства і медицини). – Київ, 2007. – 220 с.
16. *Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Семин И.Р.* Поверхностная архитектура эритроцитов периферической крови у психически больных // *Бюл. эксперимент. биологии и медицины.* – 2000. – Т. 130, №10. – С. 429–432.
17. *Новодержкина Ю.К., Шишканова З.Г., Козинец И.Г.* Конфигурация и поверхность клеток крови в норме и патологии. – М.: Триада-фарм, 2004. – 151 с.
18. *Петракович Н.Г.* Естественный и искусственный гипобиоз у человека // *Русская мысль.* – 1993. – №1–2. – С. 127–146.
19. *Прокопенко Л.Г., Конопля А.И., Бровкина И.Л.* Метаболические основы развития иммунологических процессов в условиях стресса и патологии // *Метаболическая иммуномодуляция.* – Курск, 2000. – С. 8–27.
20. *Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Степовая Е.А., Ткаченко Т.Н.* Ультраструктура эритроцитов в норме и при патологии: морфологические феномены, клинические аспекты // *Морфология.* – 2004. – Т. 126, № 5. – С. 48–51.
21. *Репин Н.В., Кирошка В.В., Головка О.И.* Анализ морфологии эритроцитов и их устойчивости в зависимости от pH и ионной силы среды в условиях гипотермического хранения // *Проблемы криобиологии.* – 2009. – Т. 19, №1. – С. 10–17.
22. *Саидов М.Б., Эмирбеков Э.З.* Перекисное окисление липидов в эритроцитах крыс при гипотермии и введении даларгина // *Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион.* Серия: Естественные науки. – 2009. – №1. – С. 70–73.
23. *Серебрякова Е.Н., Волосников Д.К., Симакова Н.В.* Морфология эритроцитов и показатели перекисного окисления
2. *Vladimirov Yu.A.* Free radical and oxidants // *Vestnik RAMN.* – 1998. – N7. – P. 43–51.
3. *Gennis R.* Biomembranes: molecular structure and functions. – Moscow: Mir, 1997. – 624 p.
4. *Gordiyenko E.A., Pushkar N.S.* Physical grounds of low temperature preservation of cell suspensions. – Kiev: Naukova Dumka, 1994. – 143 p.
5. *Gordiyenko Ye.O., Gordiyenko O.I., Kovalenko I.F. et al.* Physical-mathematical analysis of density of distribution of human donor and cord blood erythrocytes by sphericity index // *Biophysical Bulletin.* – 2000. – Issue 1(6). – P. 75–78.
6. *Gordiyenko O.I.* Temperature effect on human erythrocyte membrane permeability for 1,2-propane diol and dimethyl-sulfoxide // *Problems of Cryobiology.* – 2003. – N1. – P. 38–45.
7. *Davydova E.V., Gordiyenko O.I.* Temperature effect on erythrocytes' distribution by sphericity index // *Biophysical Bulletin.* – 2009. – Issue 2 (23). – С. 114–119.
8. *Zinchuk V.V.* Differentiation of erythrocytes: physiological aspects // *Uspekhi Physiol. Nauk.* – 2001. – Vol. 32, N3. – P. 66–77.
9. *Kizilova N.N., Tishko T.V., Tishko D.V.* Analysis of erythrocyte shape using digital holographic interference microscopy // 3rd Eurasian Congress on Medical Physics and Engineering 'Medical Physics 2010'. – Moscow, 2010. – P. 260–262.
10. *Kotelnikova L.V.* Metabolic state of erythrocytes and its correction by stabilizers of cell membranes under impairment of energetic homeostasis: Authors abstract of thesis ... Cand. biol. sciences. – Kursk, 2000. – 24 p.
11. *Kryzhanovsky G.N.* Disregulation pathology. – Moscow: Meditsina, 2002. – 630 p.
12. *Lovkova T.A.* Peculiarities of lipid metabolism under craniocerebral hypothermia // *Current issues of health state of inhabitants of Russian central region: Collection of scientific papers.* – Ryazan, 2002.– Issue 3.– P. 43–45.
13. *Lugovskaya S.A., Kozinets G.I.* Hierarchy of hematopoietic cells: kinetics, structure and function// *Klin. Lab. Diagnostika.* – 2009. – N5. – P. 21–37.
14. *Malaya L.T., Babychuk G.A., Vlasenko M.A., Chizhevskaya I.V.* The content of prostaglandines in blood of animals with experimental myocardial infarction subjected to craniocerebral hypothermia // *Kriobiologiya.* – 1986. – N2. – P. 3–6.
15. *Melnichuk S.D., Melnichuk D.O.* Hypobiosis in animals (molecular mechanisms and importance for application in agriculture and medicine). – Kyiv, 2007. – 220 p.
16. *Novitskiy V.V., Ryazantseva N.V., Syomin I.R.* Superficial architectonics of peripheric blood erythrocytes in psychiatric patients // *Bull. Eksp. Biol. Med.* – Vol. 130, N10. – P. 429–432.
17. *Novoderzhkina Yu.K., Shishkanova Z.G., Kozinets I.G.* Configuration and surface of blood cells in the norm and pathology. – Moscow: Triada-Farm, 2004. – 151 p.
18. *Petrakovich N.G.* Natural and artificial hypobiosis in human // *Russkaya Mysl.* – 1993. – N1–2. – P. 127–146.
19. *Prokopenko L.G., Konoplya A.I., Brovkina I.L.* Metabolic basics in development of immunologic processes under stress and pathology // *Metabolic immunomodulation.* – Kursk, 2000. – P. 8–27.
20. *Ryazantseva N.V., Novitskiy V.V., Stepovaya E.A., Tkachenko T.N.* Ultrastructure of erythrocytes in the norm and pathology: morphological phenomena, clinical aspects // *Morfologiya.* – 2004. – Vol. 126, N5. – P. 48–51.
21. *Repin N.V., Kiroshka V.V., Golovko O.I.* Analysis of morphology of erythrocytes and their resistance depending on pH and ionic strength under hypothermal storage // *Problems of Cryobiology.* – 2009. – Vol. 19, N1. – P. 10–17.
22. *Saidov M.B., Emirbekov E.Z.* Lipid peroxidation in rat erythrocytes at hypothermia and Dalargin introduction // *Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedeniy. Severo-Kavkazskiy Region.* Series: Life Sciences. – 2009. – N1. – P. 70–73.
23. *Serebryakova E.N., Volosnikov D.K., Simakova N.V.* Morphology of erythrocytes and indices of lipid peroxidation in

- липидов в плазме новорожденных с синдромом полиорганной недостаточности // Педиатрия. – 2012. – Т. 91, № 1. – С. 25–31.
24. *Шахламов В.А.* Основные направления развития исследований по экспериментальной гистологии и цитологии в третьем тысячелетии // Морфология. – 2002. – Т. 122, №5. – С. 15–18.
 25. *Шиффман Ф.Дж.* Патофизиология крови: Пер. с англ. под ред. Е.Б.Жибурта, Ю.Н.Токарева. – М.–СПб: БИНОМ–Невский диалект, 2000. – 448 с.
 26. *Пат. 47910А (Україна) МПК⁷ G01N33/49.* Спосіб визначення щільності ймовірності розподілу еритроцитів за індексом сферичності / Є.О. Гордієнко, О.І. Гордієнко, Ю.Є. Гордієнко та ін. – Заявлено 26.10.2001; опубл. 15.07.02, Бюл. № 7. – С. 4.106.
 27. *Bossi D., Russo M.* Hemolytic anemias due, to disorder of red cell membrane skeleton // *Mol. Aspects Med.* – 1996. – Vol. 17, №2. – P. 171–188.
 28. *Gedde M., Huestis H.* Membrane potential and human erythrocytes shape // *Biophys. J.* – 1997.– Vol. 72, №3. – P. 1220–1233.
 29. *Gimsa J., Ried C.* Do band 3 protein conformational changes mediate shape changes of human erythrocytes? // *Mol. Membr. Biol.* – 1995. – Vol. 12, №3. – P. 247–254.
 30. *Grishin S., Shakirzyanova A., Giniatullin A. et al.* Mechanisms of ATP action on motor nerve terminals at the frog neuromuscular junction // *Eur. J. Neurosci.* – 2005. – Vol. 21, №5. – P. 1271–1279.
 31. *Hasky G., Linden J., Cronstein B., Pacher P.* Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2008. – Vol. 7, №9. – P. 759–770.
 32. *Mallet M.L.* Pathophysiology of accidental hypothermia // *Q. J. Med.* – 2002. – Vol. 95, №12. – P. 775–785.
 33. *Porsolt R.D., Anton G., Blavet N., Jalfre M.* Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments // *Eur. J. Pharmacol.* – 1978. – Vol. 47, №4. – P. 379–391.
 34. *Sobota J.T., Gruber C.A., Gilbertson T.J., Wilson J.* Prostaglandin E2 – hemoglobin AA and SS erythrocyte interaction (prostaglandin-erythrocyte interaction) // *Am. J. Hematology.* – 1977. – Vol. 2, № 2. – P. 133–143.
 35. *Wong P.* A basis of echinocytosis and stomatocytosis in the disc-sphere transformations of the erythrocyte // *J. Theor. Biol.* – 1999. – Vol. 196, № 3. – P. 343–361.
 36. *Zhang Y., Xia Y.* Adenosine signalling in normal and sickle erythrocytes and beyond // *Microbes Infect.* – 2012. – Vol. 14, №10. – P. 863–873.
 37. *Ziganshin A.U., Kamaliev R.R., Grishin S.N. et al.* The influence of hypothermia on P2 receptor-mediated responses of frog skeletal muscle // *Eur. J. Pharmacol.* – 2005. – Vol. 509, №2–3. – P. 187–193.
 - blood plasma of newborns with syndrome of polyorgan insufficiency // *Pediatrics.* – 2012. – Vol. 91, N1. – P. 25–31.
 24. *Shakhlamov V.A.* Main directions in developing investigations on experimental histology and cytology in the third millenium // *Morfologiya.* – 2002. – Vol. 122, N5. – P. 15–18.
 25. *Shiffman F.J.* Blood pathophysiology. – Moscow – St. Petersburg, 2000. – 448 p.
 26. *Patent of Ukraine 47910A IPC7 G01N33/49.* Method of determining the density of probability of erythrocytes distribution by sphericity index / Ye.O. Gordiyenko, O.I. Gordiyenko, Yu.Ye. Gordiyenko et al. – Filed 26.10.2001; Published 15.07.02, Bul. N7. – P. 4.106.
 27. *Bossi D., Russo M.* Hemolytic anemias due, to disorder of red cell membrane skeleton // *Mol. Aspects Med.* – 1996. – Vol. 17, N2. – P. 171–188.
 28. *Gedde M., Huestis H.* Membrane potential and human erythrocytes shape // *Biophys. J.* – 1997.– Vol. 72, N3. – P. 1220–1233.
 29. *Gimsa J., Ried C.* Do band 3 protein conformational changes mediate shape changes of human erythrocytes? // *Mol. Membr. Biol.* – 1995. – Vol. 12, N3. – P. 247–254.
 30. *Grishin S., Shakirzyanova A., Giniatullin A. et al.* Mechanisms of ATP action on motor nerve terminals at the frog neuromuscular junction // *Eur. J. Neurosci.* – 2005. – Vol. 21, N5. – P. 1271–1279.
 31. *Hasky G., Linden J., Cronstein B., Pacher P.* Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2008. – Vol. 7, N9. – P. 759–770.
 32. *Mallet M.L.* Pathophysiology of accidental hypothermia // *Q. J. Med.* – 2002. – Vol. 95, N12. – P. 775–785.
 33. *Porsolt R.D., Anton G., Blavet N., Jalfre M.* Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments // *Eur. J. Pharmacol.* – 1978. – Vol. 47, N4. – P. 379–391.
 34. *Sobota J.T., Gruber C.A., Gilbertson T.J., Wilson J.* Prostaglandin E2 – hemoglobin AA and SS erythrocyte interaction (prostaglandin-erythrocyte interaction) // *Am. J. Hematology.* – 1977. – Vol. 2, N2. – P. 133–143.
 35. *Wong P.* A basis of echinocytosis and stomatocytosis in the disc-sphere transformations of the erythrocyte // *J. Theor. Biol.* – 1999. – Vol. 196, N 3. – P. 343–361.
 36. *Zhang Y., Xia Y.* Adenosine signalling in normal and sickle erythrocytes and beyond // *Microbes Infect.* – 2012. – Vol. 14, N10. – P. 863–873.
 37. *Ziganshin A. U., Kamaliev R.R., Grishin S.N. et al.* The influence of hypothermia on P2 receptor-mediated responses of frog skeletal muscle // *Eur. J. Pharmacol.* – 2005. – Vol. 509, N2–3. – P. 187–193.

Accepted 28.08.2012

Поступила 28.08.2012