

Чувствительность эритроцитов различных животных к гипертоническому криогемолизу

О. Н. ДЕНИСОВА¹, В. В. РАМАЗАНОВ², Г. Ф. ЖЕГУНОВ¹

¹Харьковская государственная зооветеринарная академия

²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Erythrocyte Sensitivity to Hypertonic Cryohemolysis in Different Animals

DENISOVA O.N.¹, RAMAZANOV V.V.², ZHEGUNOV G.F.¹

¹Kharkov State Veterinary Academy

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Исследовали гипертонический криогемолиз эритроцитов быка, собаки, лошади. Выявили, что чувствительность эритроцитов к факторам повреждения, pH среды и ингибиторам анионного канала имеет свои особенности. Особенности поведения эритроцитов обсуждаются в связи с различиями транспортных систем и состава мембран.

Ключевые слова: гипертонический криогемолиз, холодовой шок, чувствительность эритроцитов быка, лошади, собаки.

Досліджували гіпертонічний криогемоліз еритроцитів бика, собаки, коня. Виявили, що чутливість еритроцитів до факторів пошкодження, pH середовища та інгібіторам аніонного каналу має свої особливості. Особливості поведінки еритроцитів обговорюються в зв'язку з відмінностями транспортних систем та складу мембран.

Ключові слова: гіпертонічний криогемоліз, холодовий шок, чутливість еритроцитів бика, коня, собаки.

Hypertonic cryohemolysis of bovine, canine and equine erythrocytes was investigated. It was found-out, that the erythrocyte sensitivity to the damaging factors, pH medium and anion channel inhibitors had its peculiarities. The peculiarities of erythrocyte behavior are discussed in respect of different transport systems and membrane composition.

Key-words: hypertonic cryohemolysis, cold shock, bovine, equine and canine erythrocyte sensitivity.

Гипертонический криогемолиз – явление повреждения эритроцитов, связанное с охлаждением клеток до 0°C в гипертонических средах, что является моделью одного из факторов криповреждений [1, 9]. Вопрос изучения видовых различий чувствительности эритроцитов к охлаждению в гипертонических средах является актуальным в связи с необходимостью создания методов криоконсервирования крови домашних животных. Сравнительные исследования позволяют выявить связь между транспортными системами биомембран и чувствительностью эритроцитов. В связи с этим целью настоящей работы было исследование устойчивости эритроцитов различных животных к гипертоническому криогемолизу при охлаждении от 37 до 0°C.

Материалы и методы

Объект исследования – кровь быка, лошади и собаки. Кровь отмывали 3-4 раза раствором со 150 мМ NaCl и 10 мМ трис-HCl (pH 7,4). Холодовой шок проводили в средах, которые содержали: 0,86 М сахарозы и 10 мМ трис-HCl (pH 7,4), что позволяет создать механическое напряжение на мембране; 0,86 М сахарозы, 120 мМ Na₂SO₄, 10 мМ трис-HCl

Адрес для корреспонденции: Рамазанов В.В., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-00-71, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Hypertonic cryohemolysis is the phenomenon of erythrocyte damage, related to cell cooling down to 0°C in hypertonic media, that is the model of one of the cryodamage factors [1, 9]. The question of study of specific differences in erythrocyte sensitivity to cooling in hypertonic media is still of current importance, because of the necessity to create the methods for domestic animals' blood cryopreservation. Comparative studies allow to reveal the relationship between the biomembrane transport systems and erythrocyte sensitivity. In this connection the aim of this work was to investigate the resistance of erythrocytes to hypertonic cryohemolysis in different animals when cooling from 37 to 0°C.

Materials and methods

The subject for investigation was bovine, equine and canine blood. Blood was 3-4 times washed with the solution, containing 150mM of NaCl and 10 mM of tris-HCl (pH 7.4). The cold shock was accomplished in the media, containing as follows: 0.86 M of sucrose and 10 mM of tris-HCl (pH 7.4), that allows the creation of mechanical tension on a membrane; 0.86 M of sucrose, 120 mM of Na₂SO₄, 10 mM of tris-HCl (pH 7.4), that models an osmotic tension under chloride

Address for correspondence: Ramazanov V.V., Institute for Problems of Cryobiology&Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7720071, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

(рН 7,4), что моделирует осмотическое напряжение в условиях обмена хлорида на сульфат в эритроцитах; 0,86 М сахарозы, 25 мМ цитрат Na, 10 мМ трис-НСl (рН 7,4), что способствует созданию ионной силы среды с непроникающим ионом, равной ионной силе изотонического раствора NaCl. Суспензии эритроцитов охлаждали от 37 до 0°C перемещением пробирок из термостата на ледяную баню. Для исследования влияния рН среды на холодовую чувствительность эритроцитов использовали среду, содержащую 0,86 М сахарозы, 150 мМ NaCl, 10 мМ трис-НСl (рН 5,8; 6,6; 7,4; 8,2), при охлаждении от 37 до 0°C. В экспериментах была выбрана сахарозная, а не солевая среда, чтобы создать условия диффузии неорганических ионов через мембрану [2]. Гипертонический холодовой шок осуществляли, как было описано в [10], путем выдерживания клеток крови в различных средах при 37°C от 2-х до 20 мин с последующим охлаждением до 0°C в течение 5 мин.

Для блокирования потоков анионов хлорида и сульфата через мембрану использовали ингибиторы анионного транспорта: ДИДС (4,4'-диизоцианостилбен-2,2'-дисульфат) – ингибитор необратимого действия и дипиридамо́л – ингибитор обратимого действия.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены данные о развитии гипертонического криогемолиза эритроцитов быка при охлаждении до 0°C. Видно, что выдерживание суспензии эритроцитов до 20 мин перед охлаждением в различных гипертонических растворах не приводит к значительному повышению чувствительности клеток, что отмечается также для эритроцитов лошади и собаки (рис. 2, 3).

Действие ингибиторов анионного канала в указанных условиях зависит от анионного состава среды. Слабо проникающий в среде анион сульфата приводит к подавлению развития холодowego шока эритроцитов быка (рис. 1, а), а в присутствии цитрата уровень гемолиза возрастает (рис. 1, б). Ингибиторы анионного канала ДИДС и дипиридамо́л не вызывают изменений в динамике развития гипертонического криогемолиза в среде, содержащей 0,86 М сахарозы, 120 мМ Na₂SO₄, 10 мМ трис (рН 7,4). Подобная картина наблюдается в бессолевой среде (рис. 1, в). При наличии цитрата отмечается наиболее высокая чувствительность клеток к холодovому шоку и при добавлении дипиридамо́ла чувствительность к охлаждению возрастает. Если дипиридамо́л значительно повышает холодovую чувствительность клеток, то ДИДС существенно её снижает.

Таким образом, для эритроцитов быка характерна низкая чувствительность к холодovому шоку как при отсутствии, так и при наличии проникающего аниона сульфата, а в присутствии непроникающего аниона

for sulphate exchange conditions in erythrocytes; 0.86 M of sucrose, 25 mM of Na citrate, 10 mM of tris-HCl (pH 7.4), that permits to create the medium ionic strength with a non-penetrating ion, being equal to ionic strength of NaCl isotonic solution. Erythrocyte suspensions were cooled down from 37 to 0°C by transferring the vials from thermostat to an ice bath. In order to investigate the effect of pH medium on the erythrocyte cold sensitivity we used the medium, containing 0.86.M of sucrose, 150 mM of NaCl, 10 mM of tris-HCl (pH 5.8; 6.6; 7.4; 8.2) at cooling from 37 to 0°C. For the experiments we have chosen a sucrose, but not saline medium to create the conditions for inorganic ion diffusion through a membrane [2]. A hypertonic cold shock was performed as described in the paper [10], via blood cell maintaining in different media at 37°C from 2 to 20 min with following cooling down to 0°C for 5 min.

For blocking the chloride and sulphate anion flows through a membrane there were used such anion transport inhibitors as: DIDS (4,4' - diisocyanostilbene-2,2'-disulphonate), the inhibitor of irreversible action, and dipyridamol, which is a reversible one.

Results and discussion

The Fig. 1 demonstrates the data on the development of bovine erythrocyte hypertonic cryohemolysis at cooling down to 0°C. The exposure of erythrocyte suspension up to 20 min before cooling in different hypertonic solutions is shown not to be resulted in a considerable increase in cell sensitivity, that is also observed for equine and canine erythrocytes (Fig. 2, 3).

The action of the anion channel inhibitors under the mentioned conditions depends on an anion medium composition. The presence in the medium of a slightly penetrating sulphate anion results in the suppression of cold shock development in bovine erythrocytes (Fig. 1, a), but there is an increase in hemolysis level in citrate presence (Fig. 1, b). The anion channel inhibitors DIDS and dipyridamol do not cause the changes in the dynamics of hypertonic cryohemolysis development in the medium, containing 0.86 M of sucrose, 120 mM of Na₂SO₄, 10 mM of tris (pH 7.4). The same picture is observed in a saline-free media (Fig. 1, c). In citrate presence the highest cell sensitivity to cold shock is noted and there is an increase in the sensitivity to cooling with dipyridamol addition. If dipyridamol considerably increases a cold sensitivity of cells, DIDS in a considerably extent reduces it.

Thus, a low sensitivity to cold shock was characteristic for bovine erythrocytes both in the absence and presence of a penetrating sulphate anion, but in the presence of a non-penetrating citrate anion under cooling conditions it occurs to be more manifested.

The sensitivity of equine erythrocytes to hypertonic cryohemolysis is more manifested (40-45%) and does

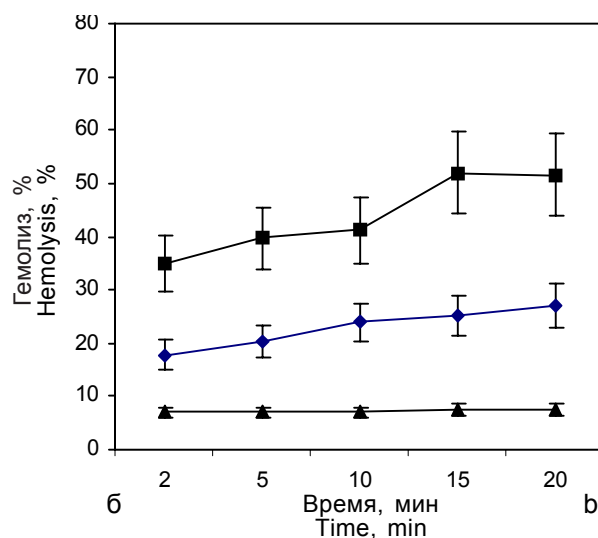
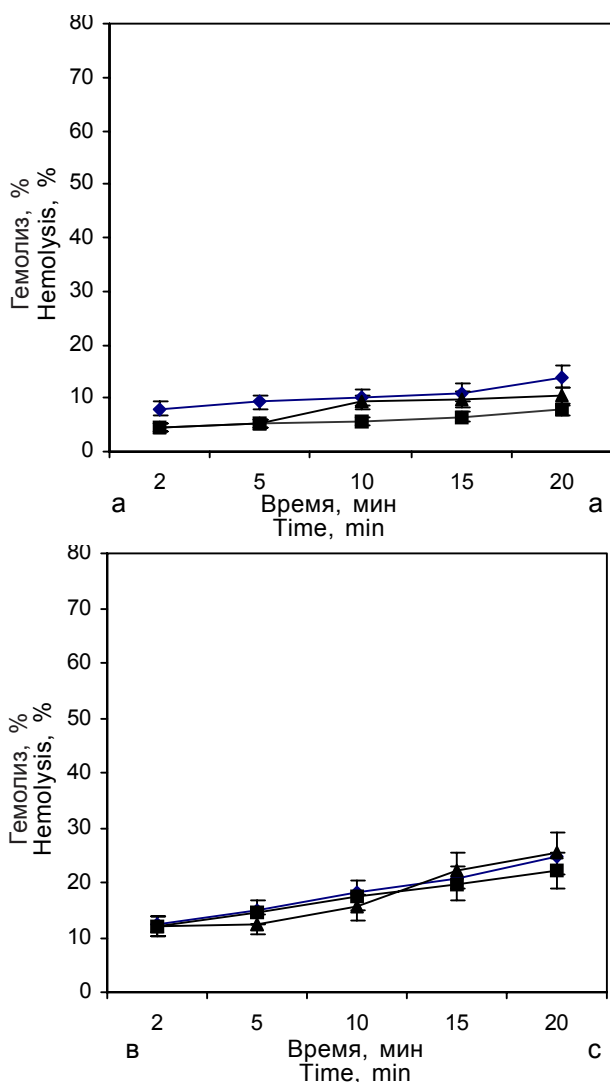


Рис. 1. Влияние на гипертонический криогемолиз эритроцитов быка различных сред, ингибиторов анионного канала и времени инкубации при 37°C: а – 0,86 М сахарозы, 120 мМ Na₂SO₄, 10 мМ трис (рН 7,4); б – 0,86 М сахарозы, 25 мМ цитрата натрия, 10 мМ трис (рН 7,4); в – 0,86 М сахарозы, 10 мМ трис (рН 7,4). ♦ – контроль; ■ – дипиридамо́л; ▲ – ДИДС.

Fig. 1. The effect of different media, anion channel inhibitors and incubation time on bovine erythrocyte's hypertonic cryohemolysis at 37°C: a – 0.86 M of sucrose, 120 mM of Na₂SO₄, 10 mM of tris (pH 7.4); b – 0.86 M of sucrose, 25 mM of sodium citrate, 10 mM of tris (pH 7.4); c – in 0.86 M of sucrose, 10 mM of tris (pH 7.4). ♦ – the control; ■ – dipyrindamol; ▲ – DIDS.

цитрата в условиях охлаждения она становится выраженной.

Чувствительность эритроцитов лошади к гипертоническому криогемолизу выражена сильнее (40-45%) и не зависит от времени инкубации при 37°C. В присутствии проникающего аниона сульфата уровень холодого гемолиза значительно не изменяется, при этом ДИДС повышает степень повреждения клеток, а дипиридамо́л практически не изменяет уровень развития холодого шока (рис.2, а). Степень гемолиза эритроцитов в среде, содержащей 0,86 М сахарозы, 25 мМ цитрата Na, 10 мМ трис (рис.2, б), значительно не отличается от такового в сульфатной (рис.2, а) или бессульфатной среде (рис.2, в). В этих условиях дипиридамо́л вызывает существенный рост чувствительности эритроцитов лошади к гипертоническому криогемолизу, а присутствие ДИДС резко подавляет холодого шок.

Несмотря на то, что чувствительность эритроцитов лошади к охлаждению в гипертонической среде значительно выше, чем у быка, реакция эритроцитов на присутствие проникающих и непро-

not depend on the incubation time at 37°C. At the presence of a penetrating sulphate anion the level of cold hemolysis does not considerably change, at the same time DIDS increases the extent of cell damage, but dipyrindamol almost does not change the level of cold shock development (Fig. 2, a). The degree of erythrocyte hemolysis in the medium, containing 0.86 M of sucrose, 25 mM of sodium citrate, 10 mM of tris (Fig. 2, b) does not significantly differ from that in a sulphate (Fig. 2, a) or sulphate-free medium (Fig. 2, b). Under these conditions dipyrindamol causes a considerable growth of equine erythrocyte sensitivity to hypertonic cryohemolysis and the DIDS presence sharply suppresses a cold shock.

In spite of the fact, that the sensitivity of equine erythrocytes to cooling in a hypertonic medium is considerably higher, than a bovine one, the erythrocyte response to the presence of penetrating and non-penetrating anions, as well as the anion channel inhibitors is similar for both cases.

Canine erythrocytes respond in a different way to cooling at the presence of penetrating and non-penetrating anions and anion channel inhibitors. There is an increase in a cell sensitivity to cold shock within the range from 2 to 20 min (22-45%). The citrate causes no changes in cold shock dynamics (Fig. 3, b),

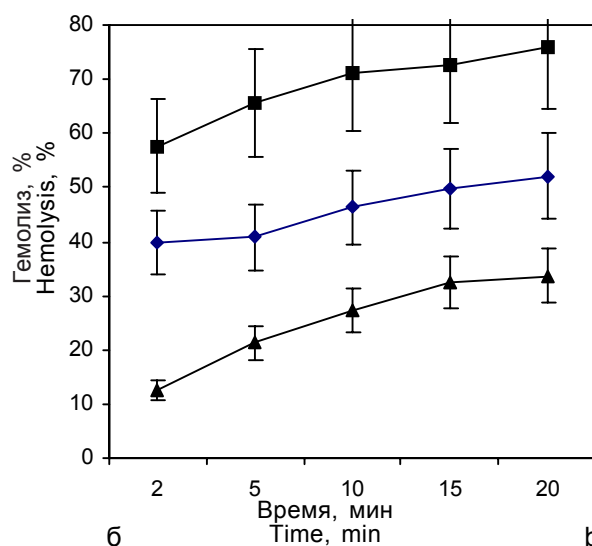
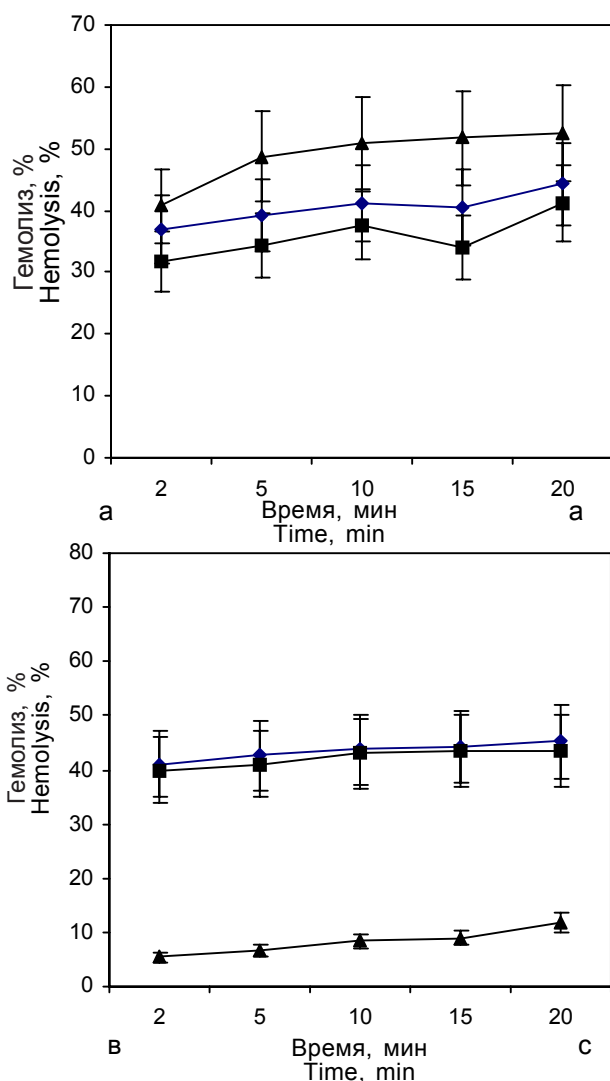


Рис. 2. Влияние на гипертонический криогемолиз эритроцитов лошади различных сред, ингибиторов анионного канала и времени инкубации при 37°C: а – 0,86 М сахарозы, 120 мМ Na₂SO₄, 10 мМ трис (рН 7,4); б – 0,86 М сахарозы, 25 мМ цитрата натрия, 10 мМ трис (рН 7,4); в – 0,86 М сахарозы, 10 мМ трис (рН 7,4). ♦ – контроль; ■ – дипиридамо; ▲ – ДИДС.

Fig. 2. The effect of different media, anion channel inhibitors and incubation time on equine erythrocyte's hypertonic cryohemolysis at 37°C: a – 0.86 M of sucrose, 120 mM of Na₂SO₄, 10 mM of tris (pH 7.4); b – 0.86 M of sucrose, 25 mM of sodium citrate, 10 mM of tris (pH 7.4); c – in 0.86 M of sucrose, 10 mM of tris (pH 7.4). ♦ – the control; ■ – dipyrindamol; ▲ – DIDS.

никающих анионов, а также ингибиторов анионного канала в обоих случаях носит сходный характер.

Эритроциты собаки реагируют на охлаждение в присутствии проникающих и непроникающих анионов и ингибиторов анионного канала иначе. Чувствительность клеток к холодовому шоку в интервале от 2-х до 20 мин возрастает (22-45%). Цитрат не вызывает изменений в динамике холодового шока (рис.3, б), а проникающий сульфат (рис.3, а) блокирует его развитие (от 10 до 15% с 2-х до 20 мин). ДИДС и дипиридамо не оказывают существенного влияния на клетки в среде, содержащей цитрат. При этом в бессолевой среде ДИДС значительно стимулирует уровень холодового гемолиза, тогда как дипиридамо его снижает (рис.3, в). В среде с сульфатом ДИДС увеличивает уровень гемолиза, а дипиридамо влияет незначительно.

Таким образом, эритроциты собаки отличаются от эритроцитов быка и лошади по их реакции на охлаждение в гипертонических средах в условиях ингибирования анионного транспорта.

Согласно [8], объём эритроцитов существенно зависит от рН среды. Сдвиг рН в кислую сторону

but a penetrating sulphate (Fig. 3, a) blocks its development (from 10 to 15% from 2 to 20 min). DIDS and dipyrindamol do not cause a significant effect on cells in citrate-medium. At the same time DIDS stimulates in a considerable extent the level of cold hemolysis in a saline-free medium, whereas dipyrindamol reduces it (Fig. 3, c). DIDS augments the level of hemolysis in sulphate-medium, but dipyrindamol effect is slight.

Thus, the canine erythrocytes differ from bovine and equine ones upon their response to cooling in hypertonic media under the anion transport inhibition conditions.

According to the paper [8], the erythrocyte volume greatly depends on the medium pH. The pH shift towards an acid side results in the entrance of chloride anion into the cells, that is accompanied by the erythrocyte volume augmentation. The hemolysis of bovine erythrocytes is slightly manifested independently on an increase or decrease in pH within 5.8-8.2 interval, and the anion channel inhibitors do not cause a visible effect (Fig. 4, a). For equine erythrocytes a slight pH shift, lower or higher than a physiological level, does not as well cause the considerable changes in cold shock sensitivity (Fig. 4, b). The canine erythrocytes manifest a significant dependency on pH

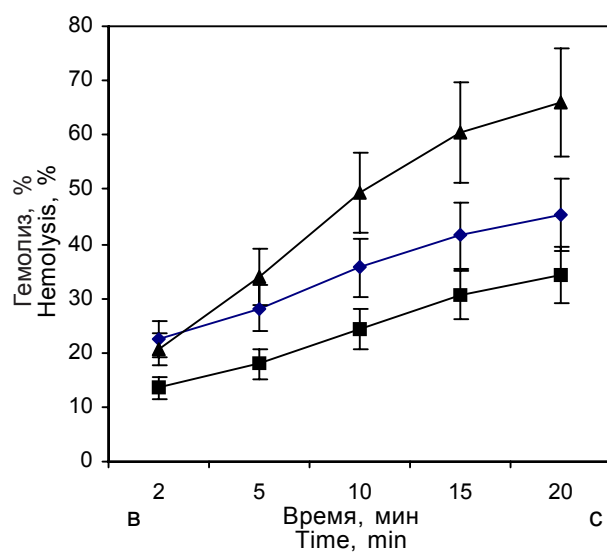
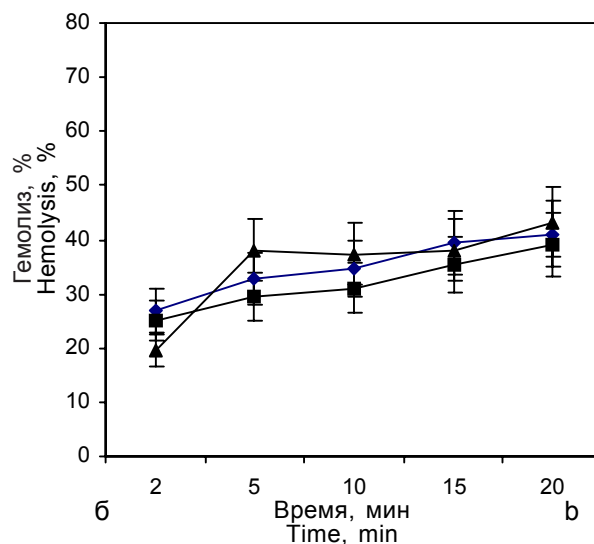
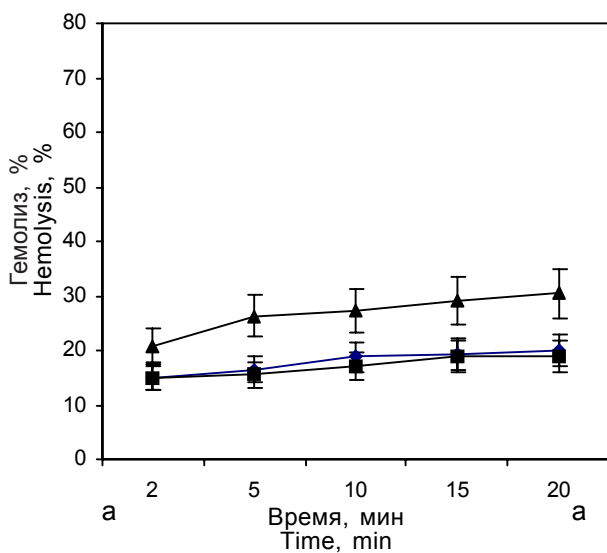


Рис. 3. Влияние на гипертонический криогемолиз эритроцитов собаки различных сред, ингибиторов анионного канала и времени инкубации при 37°C: а – 0,86 М сахарозы, 120 мМ Na₂SO₄, 10 мМ трис (рН 7,4); б – 0,86 М сахарозы, 25 мМ цитрата натрия, 10 мМ трис (рН 7,4); в – 0,86 М сахарозы, 10 мМ трис (рН 7,4). ♦ – контроль; ■ – дипиридамо; ▲ – ДИДС.

Fig. 3. The effect of different media, anion channel inhibitors and incubation time on canine erythrocyte's hypertonic cryohemolysis at 37°C: a – 0.86 M of sucrose, 120 mM of Na₂SO₄, 10 mM of tris (pH 7.4); b – 0.86 M of sucrose, 25 mM of sodium citrate, 10 mM of tris (pH 7.4); c – in 0.86 M of sucrose, 10 mM of tris (pH 7.4). ♦ – the control; ■ – dipyridamol; ▲ – DIDS.

приводит к поступлению анионов хлорида в клетки, что сопровождается увеличением объема эритроцитов. Если pH изменять в щелочную сторону, то анионы хлора перераспределяются из клеток в среду, при этом объем эритроцитов уменьшится, что может сказаться на холодовой чувствительности эритроцитов. Гемолиз эритроцитов быка слабо выражен независимо от повышения или понижения pH в интервале 5,8-8,2, а ингибиторы анионного канала не оказывают заметного влияния (рис. 4, а). Для эритроцитов лошади небольшой сдвиг pH ниже или выше физиологического уровня также не вызывает значительных изменений в чувствительности к холодовому шоку (рис.4, б). Эритроциты собаки проявляют значительную зависимость от pH (рис.4, в). В кислой среде наблюдается снижение уровня гемолиза, в то время как при щелочных pH отмечено его повышение. При этом в присутствии ДИДС отмечается существенное увеличение повреждения клеток.

Полученные результаты по действию гипертонии и pH-зависимости криогемолиза эритроцитов

(Fig. 4, c). A decrease in hemolysis level is observed in acid medium, meanwhile its increase is noted at alkaline pH. At the same time a significant augmentation of cell damage is observed at DIDS presence.

The results obtained on the action of hypertension and pH-dependency of erythrocyte cryohemolysis testify to unequal cell sensitivity in different animals, that is apparently related to specific differences of cells themselves, the structure of erythrocyte membrane, as well as the cytoskeletal peculiarities.

If we shift pH towards the alkaline side, the chlorine anions are redistributed out of cells into the medium, at the same time the erythrocyte volume reduces, that can affect a cold sensitivity of erythrocytes.

In particular, the canine erythrocytes are characterised by a high intracellular content of sodium ions and a low one of potassium [4, 5]. The mentioned peculiarity of these cells is stipulated by the absence of sodium-potassium pump [7, 14]. The presence of a system for calcium and sodium passive transport, functioning as a volume regulator, is characteristic for them. Of note is that during a progressive sodium increase, the change in the medium pH occurs [15, 17]. The sodium transport is a chloride-dependent one [16]. The release of anions out of a cell depends on their intracellular concentration, the medium pH, as

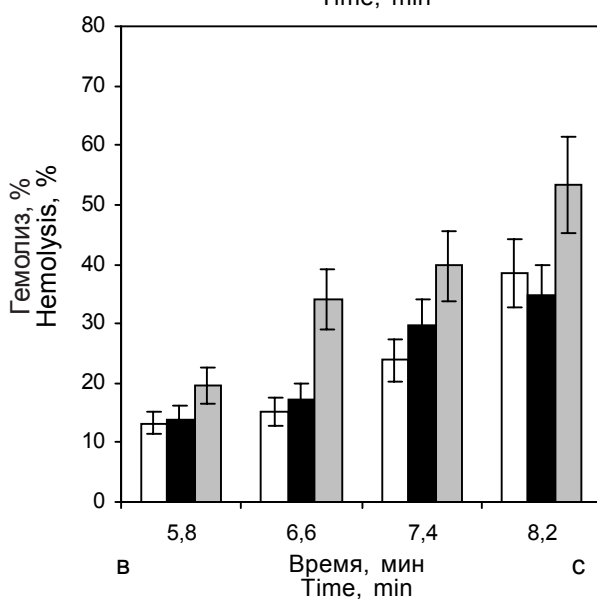
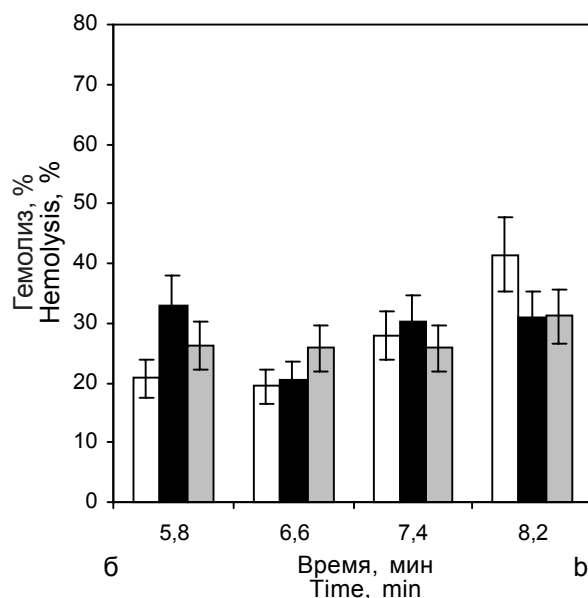
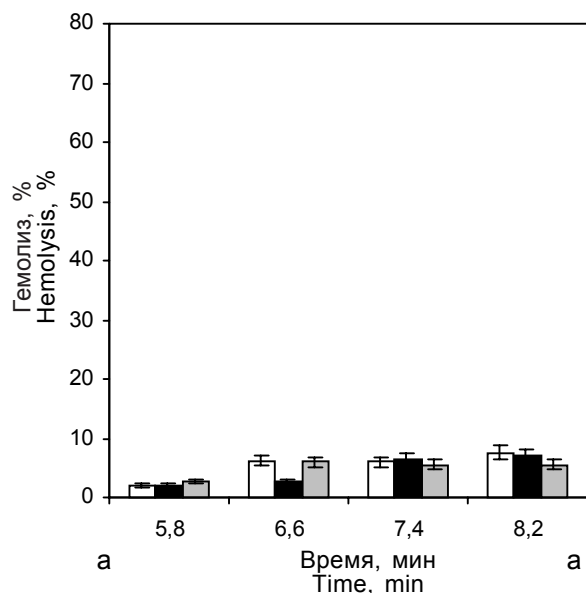


Рис. 4. Зависимость от pH среды инкубации гипертонического криогемолиза эритроцитов: а – быка; б – лошади; в – собаки. □ – контроль; ■ – дипиридамо́л; ▒ – ДИДС.

Fig. 4. Dependence of erythrocyte hypertonic cryohemolysis on incubation medium pH: a – for bovine one; b – for equine one; c – for canine one. □ – the control; ■ – dipyridamol; ▒ – DIDS.

свидетельствуют о неодинаковой чувствительности клеток различных животных, что, по-видимому, связано с видовыми различиями самих клеток, структуры мембран эритроцитов, а также особенностями цитоскелета.

В частности, эритроциты собак характеризуются высоким внутриклеточным содержанием ионов натрия и низким калия [4, 5]. Отмеченная особенность этих клеток обусловлена отсутствием натрий-калиевого насоса [7, 14]. Для них также характерно наличие системы пассивного транспорта кальция и натрия, которая функционирует как регулятор объема. Важно отметить, что при прогрессивном увеличении натрия происходит изменение pH среды [15, 17]. Транспорт натрия является хлорид-зависимым [16]. Выход анионов из клетки зависит от их внутри-клеточной концентрации, pH среды, а также от наличия в ней ингибиторов

well as on the presence in it of anion channel inhibitors [4]. The canine erythrocytes contain mono- and diglycerides [13].

The peculiarity of equine erythrocytes is the fact, that they have a high sodium-lithium antitransport, a monodirected flow of sodium through a sodium pump is in 3-4 times lower, than in human red blood cells [6]. Phosphatidylcholine makes 41.3% of all phospholipids of equine erythrocytes and its 60% are located in an external membrane layer [13]. A high concentration of band 4, 9 protein, the absence of band 4,2 and 6 proteins are characteristic for equine erythrocytes [3, 11].

Bovine erythrocytes are characterised by a high content of sphingomyelin and a low rate of potassium ion exchange. In the erythrocytes of ruminants there are few or no phosphatidylcholines [18]. In bovine erythrocytes the cholesterol makes 80% of the total number of neutral lipids, complex cholesterol ether does 4%, triglycerides do 10% and carbohydrates do 6% [13]. The conformation of cytoplasmic domain of bovine band 3 protein is similar with a human band 3 protein, although there are structural differences in areas. DIDS is bound with the bovine band 3 protein in 1:1 approximate molar ratio [12]. The similar differences can stipulate a different response to hypertonic cryohemolysis.

Such cytoskeletal modifiers as hemin impairs the band 4.1 protein interaction in a membrane, that results

анионного канала [4]. Эритроциты собаки содержат моно- и диглицериды [13].

Особенностью эритроцитов лошади является то, что они имеют высокий противотранспорт натрий-лития, однонаправленный поток натрия через натриевый насос в 3-4 раза медленнее, чем у человека [6]. Фосфатидилхолин составляет 41,3% всех фосфолипидов эритроцитов лошади и 60% его расположено в наружном слое мембраны [13]. Для эритроцитов лошади характерна большая концентрация белка полосы 4,9, отсутствие белков полос 4,2 и 6 [3, 11].

Эритроциты быка характеризуются высоким содержанием сфингомиелина и низкой скоростью обмена ионов калия. Эритроциты жвачных содержат мало или вообще не содержат фосфатидилхолин [18]. В эритроцитах быка 80% от общего количества нейтральных липидов составляет холестерин, 4% – сложный эфир холестерина, 10% – триглицериды и 6% – углеводы [13]. Конформация цитоплазматического домена бычьего белка полосы 3 сходно с белком полосы 3 человека, хотя имеются структурные различия областей. ДИДС связывается с бычьим белком полосы 3 приблизительно в молярном соотношении 1:1 [12]. Подобные отличия могут обуславливать разную реакцию гипертонического криогемолиза.

Такие модификаторы цитоскелета, как гемин, нарушают взаимодействие белка 4.1 в мембране, что приводит к значительному снижению уровня гипертонического криогемолиза [2]. Если клетки обработать йодацетамидом и парахлормеркурий-бензоатом (данная обработка приводит к нарушению взаимодействия белка полосы 3 с белками цитоскелета), тогда чувствительность клеток к гипертоническому криогемолизу несколько возрастает и при этом снижается протектирующее действие ингибиторов транспорта анионов (ДИДС) на повреждение клеток при охлаждении [2]. Это означает, что чувствительность эритроцитов к гипертоническому криогемолизу существенным образом зависит от состояния как мембранного скелета, так и систем транспорта ионов.

Выводы

Таким образом, полученные результаты позволяют отметить, что все использованные эритроциты животных по-разному чувствительны к гипертоническому криогемолизу, слабо зависят от pH среды и неоднозначно отвечают на действие ингибиторов анионного канала. Наименее чувствительными к охлаждению в гипертонической среде оказались эритроциты быка. У них отмечаются слабая выраженность уровня гемолиза и наиболее слабая зависимость от pH среды. Более выражено повреждение в гипертонических растворах у эритроцитов собаки. Самая высокая чувствитель-

in a considerable decrease in the hypertonic cryohemolysis level [2]. When treating the cells with iodoacetamide and parachloromercuribenzoate (this treatment results in a disorder of band 3 protein interaction with cytoskeletal proteins), a cell sensitivity to hypertonic cryohemolysis slightly increases and at the same time there is a decrease in a protecting effect of anion transport inhibitors (DIDS) on the cell damage at cooling [2]. It means that the erythrocyte sensitivity to hypertonic cryohemolysis considerably depends on the state of both membrane skeleton and ion transport systems.

Conclusions

Thus, the results obtained allow to note, that all used animal erythrocytes have a different sensitivity to hypertonic cryohemolysis, slightly depend on medium pH and in various ways respond to the action of anion channel inhibitors. Bovine erythrocytes occurred to be less sensitive to cooling. A slight manifestation of hemolysis level and the slightest dependence on pH medium are noted in them. The damage in hypertonic solutions is more manifested in dogs. The highest sensitivity to cold cryohemolysis is observed in equine erythrocytes. The results of the experiments conducted should be taken into account when developing the methods for hypothermic storage and cryopreservation of the mentioned animals' erythrocytes.

References

1. *Bondarenko V.A.* Development and prevention of temperature shock of erythrocytes: Author's abstract of thesis for doctor's degree obtaining (biology).– Kharkov, 1988.– 30 p.
2. *Ramazanov V.V.* Effect of osmotic stress and different cytoskeletal modifiers on cold and hypertonic stress development: Author's abstract of thesis of candidate's degree obtaining (biology).– Kharkov, 1993.– 14p.
3. *Baskurt O.K., Farley R.F., Meiselman H.J.* Erythrocyte aggregation tendency and cellular properties in horse, human and rat: a comparative study // *Am. J. Physiol.*– 1997.– Vol. 273, N6.– P. 2604-2612.
4. *Castanova V., Weise M.J., Hoffman J.F.* Anion transport in dog, cat and human red cells // *J. Gen. Physiol.*– 1974.– Vol. 74.– P. 319-334.
5. *Catchpole H.R., Engel M.B.* Microprobe analysis of element distribution in rabbit and dog erythrocytes as examples of "high" and "low" potassium cells // *Scanning Microsc.*– 1996.– Vol. 10, N3.– P. 745-752.
6. *Conteras A., Martinez R., Deves R., Marusic E.T.* An unusual pattern of Na⁺ and K⁺ movements across the horse erythrocyte membrane // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1986.– Vol. 856, N2.– P. 388-391.
7. *Fujise H., Yamada I., Masuda M. et al.* Several cation transporters and volume regulation in high-K dog red blood cells // *Am. J. Physiol.*– 1991.– Vol. 260, N3.– P. 589-597.
8. *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.– Vol. 81.– N2.– P. 43-47.
9. *Green F.A., Jung C.Y.* Cold-induced hemolysis in a hypertonic milieu // *J. Membrane Biol.*– 1997.– Vol. 33.– P. 249-262.

ность к холодовому криогемолизу наблюдается у эритроцитов лошади. Результаты проведенных экспериментов следует учитывать при разработке методов гипотермического хранения и криоконсервировании эритроцитов указанных животных.

Литература

1. *Бондаренко В.А.* Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов: Автореф. дис... докт. биол. наук.– Харьков, 1988. – 30 с.
2. *Рамазанов В.В.* Влияние осмотического стресса и различных модификаторов цитоскелета на развитие холодового и гипертонического шока: Автореф. дис... канд. биол. наук.– Харьков, 1993.– 14 с.
3. *Baskurt O.K., Farley R.F., Meiselman H.J.* Erythrocyte aggregation tendency and cellular properties in horse, human and rat: a comparative study // *Am. J. Physiol.*– 1997.– Vol. 273, N6.– P. 2604-2612.
4. *Castanova V., Weise M.J., Hoffman J.F.* Anion transport in dog, cat and human red cells // *J. Gen. Physiol.*– 1974.– Vol. 74.– P. 319-334.
5. *Catchpole H.R., Engel M.B.* Microprobe analysis of element distribution in rabbit and dog erythrocytes as examples of “high” and “low” potassium cells // *Scanning Microsc.*– 1996.– Vol. 10, N3.– P. 745-752.
6. *Conteras A., Martinez R., Deves R., Marusic E.T.* An unusual pattern of Na⁺ and K⁺ movements across the horse erythrocyte membrane // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1986.– Vol. 856, N2.– P. 388-391.
7. *Fujise H., Yamada I., Masuda M. et al.* Several cation transporters and volume regulation in high-K dog red blood cells // *Am. J. Physiol.*– 1991.– Vol. 260, N3.– P. 589-597.
8. *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.– Vol. 81.– N2.– P. 43-47.
9. *Green F.A., Jung C.Y.* Cold-induced hemolysis in a hypertonic milieu // *J. Membrane Biol.*– 1997.– Vol. 33.– P. 249-262.
10. *Green F.A., Jung C.Y.* Hypertonic cryohemolysis: ionophore and pH effects // *J. Membrane Biol.*– 1978.– Vol. 39, N2-3.– P. 273-284.
11. *Matei H., Frentescu L., Benga G.* Comparative studies of protein composition of red blood cell membranes from eight mammalian species // *J. Cell Mol. Med.*– 2000.– 4 (4)– P. 270-276.
12. *Mosior M., Bialas W.A., Gomulkiewicz J.* Effect of DIDS on osmotic properties of bovine erythrocytes // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1988.– Vol. 945, N1.– P. 51-55.
13. *Nelson G.J.* Composition of neutral lipids from erythrocytes of common mammals // *J. Lipid Res.*– 1967.– Vol. 8, N4.– P. 374-379.
14. *Parker J.C., Glosson P.S.* Interactions of sodium-proton exchange mechanism in dog red blood cells with N-phenylmaleimide // *Am. J. Physiol.*– 1987.– Vol. 253, N1.– P. 60-65.
15. *Parker J.C.* Passive calcium movements in dog red blood cells: anion effects // *Am. J. Physiol.*– 1983.– Vol. 244, N5.– P. 318-323.
16. *Parker J.C.* Volume-responsive sodium movements in dog red blood cells // *Am. J. Physiol.*– 1983.– Vol. 244, N5.– P. 324-330.
17. *Parker J.C., Gitelman H.J., Glosson P.S., Leonard D.L.* Role of calcium in volume regulation by dog red blood cells // *J. Gen. Physiol.*– 1975.– Vol. 65, N1.– P. 84-96.
18. *Utoh J., Zajkowski-Brown J.E., Harasaki H.* Effects of heat on fragility and morphology of human and calf erythrocytes // *J. Invest. Surg.*– 1992.– Vol. 5, N4.– P. 305-313.

Accepted in 16.09. 2003

Поступила 16.09.2003