

Влияние криопротекторов на уровень гипертонического криогемолиза эритроцитов человека с модифицированным цитоскелет-мембранным комплексом

UDC 57.043:577.352.4:611.018.51:547.422

YA.O. CHERKASHINA

Effect of Cryoprotectants on Hypertonic Cryohemolysis Rate of Human Erythrocytes with Modified Cytoskeleton-Membrane Complex

Исследовали развитие гипертонического криогемолиза эритроцитов, модифицированных iodoacetamide (IAA) и p-chlormercuribenzoate (p-CMB) в средах, содержащих криопротекторы (глицерин, 1,2-пропандиол, полиэтиленгликоль-1500). Показано, что независимо от присутствия в среде инкубации криозащитных соединений модификация белкового компонента эритроцитов IAA и p-CMB приводит к повышению чувствительности эритроцитов к гипертоническому криогемолизу, что может быть обусловлено изменением конформации белков, прямо или опосредованно вовлеченных в механизмы адаптации клеток к стрессовым воздействиям.

Ключевые слова: гипертонический криогемолиз, эритроциты, криопротекторы, модификаторы сульфгидрильных групп белков.

Досліджували розвиток гіпертонічного криогемолізу еритроцитів, що модифіковані iodoacetamide (IAA) та p-chlormercuribenzoate (p-CMB) у середовищах, що містять криопротектори (гліцерин, 1,2-пропандіол, поліетиленгліколь-1500). Показано, що незалежно від присутності у середовищі інкубування криозахисних сполук, модифікація білкового компонента IAA та p-CMB призводить до підвищення чутливості клітин до гіпертонічного криогемолізу, що може бути обумовлено зміною конформації білків, прямо чи опосередковано залучених у механізми адаптації клітин до стресових дій.

Ключові слова: гіпертонічний криогемоліз, еритроцити, криопротектори, модифікатори сульфгидрильних груп білків.

There was studied the development of hypertonic cryohemolysis of erythrocytes, modified with iodoacetamide (IAA) and p-chlormercuribenzoate (p-CMB) in the media containing cryoprotectants (glycerol, 1,2-propane diol, polyethylene glycerol-1500). It has been shown that independently on the presence in the incubation medium of cryoprotective compounds when modifying the protein component of erythrocytes with IAA and p-CMB the sensitivity of erythrocytes to hypertonic cryohemolysis increases. This may be stipulated with the change in conformation of the proteins directly or indirectly involved into adaptation mechanisms of cells to stress effects.

Key words: hypertonic cryohemolysis, erythrocytes, cryoprotectants, modifiers of protein sulfhydryl groups.

В настоящее время все более широкое применение приобретает длительное низкотемпературное хранение клеточных суспензий, тканей и других биологических объектов [11, 15]. Поэтому важно изучение процессов, происходящих на различных этапах криоконсервирования биообъектов. Известно [1, 11], что при замораживании клеток изменяются осмотические и температурные условия среды. Частично такие условия можно смоделировать в процессе гипертонического криогемолиза, который представляет собой лизис клеток, подвергнутых инкубации в гипертонических средах при положительных температурах и последующему охлаждению до 0°C. Поскольку криопротекторы могут снижать чувствительность эритроцитов человека к гипертоническому криогемолизу [3], представляло интерес исследовать их влияние на

Nowadays long-term low temperature storage of cell suspensions, tissues and other biological objects has gained wider application [11, 15], therefore investigation of the processes occurring at different stages of the cryopreservation is important. During freezing of cells the osmotic and temperature environmental conditions is known to vary [1, 11]. These conditions could be partly simulated with hypertonic cryohemolysis, representing the lysis of cells subjected to incubation in hypertonic media at positive temperatures and following cooling down to 0°C. It has been shown that under certain conditions the cryoprotectants reduce the sensitivity of human erythrocytes to hypertonic cryohemolysis [3], therefore there was interesting to study the effect of cryoprotectants on development of hemolytic injury in erythrocytes with modified cytoskeleton-membrane complex.

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

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

* Адрес для корреспонденции: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-41-35, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта: nardidyana@gmail.com

* Address for correspondence: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 4135, fax: +380 57 373 3084, e-mail: nardidyana@gmail.com

развитие гемолитического повреждения эритроцитов с модифицированным цитоскелет-мембранным комплексом.

Цель работы – исследовать влияние криопротекторов (глицерин, 1,2-пропандиол, полиэтиленгликоль-1500) на уровень гипертонического криогемолиза эритроцитов человека с модифицированным цитоскелет-мембранным комплексом (iodoacetamide и p-chloromercuribenzoate) в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl.

Материалы и методы

В экспериментах были использованы эритроциты донорской крови II группы, полученные по общепринятой методике. Все экспериментальные среды готовили на 10 ммоль/л трис-HCl-буфере, pH 7,4. Для насыщения эритроцитов проникающими криопротекторами (глицерин, 1,2-пропандиол) клетки предварительно инкубировали в физиологическом растворе, содержащем криопротектор 5%, в течение 30 мин при 37°C. Обработку эритроцитов модификаторами белков проводили по методу, описанному ранее [9]. Клетки инкубировали с 15 ммоль/л iodoacetamide («Serva», США) в течение 20 мин, затем добавляли p-chloromercuribenzoate («Sigma», США) в концентрации 1 ммоль/л и инкубировали 1 ч.

Гипертонический криогемолиз осуществляли следующим образом: клетки инкубировали в растворе 1,2 моль/л NaCl при температуре 37°C в течение 1–60 мин, затем экспонировали при 0°C в среде той же тоничности 10 мин. Среда, в которой инкубировали клетки в процессе гипертонического криогемолиза, содержала один из криопротекторов (5% глицерина, 5% 1,2-пропандиола и 20% полиэтиленгликоля-1500 (ПЭГ-1500)). Инкубирование эритроцитов в гипертонической среде при температуре 37°C считали 1-м этапом, а экспонирование клеток при 0°C – 2-м этапом гипертонического криогемолиза. После проведения гипертонического криогемолиза клетки осаждали центрифугированием в течение 3 мин при 1500g. Содержание вышедшего в супернатант гемоглобина регистрировали спектрофотометрически на СФ 4А с проточной кюветой при длине волны 543 нм. Выход гемоглобина из клетки рассчитывали в процентах относительно 100%-го гемолиза эритроцитов в присутствии 0,1%-го раствора тритона X-100.

Результаты статистически обрабатывали с использованием метода Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение

Iodoacetamide (IAA) и p-chloromercuribenzoate (p-CMB) являются белковыми реагентами, которые взаимодействуют с SH-группами белков эрит-

The research aim was to study the effect of cryoprotectants (glycerol, 1,2-propane diol, polyethylene glycol-1500) on hypertonic cryohemolysis of erythrocytes with modified cytoskeleton-membrane complex (iodoacetamide and parachloromercurium benzoate) in the media containing 1.2 mol/l NaCl.

Materials and methods

Conventionally obtained erythrocytes of group II donor blood were used in the experiments. All the used media were prepared on base of 10 mmol/l tris-HCl-buffer, pH 7.4. To saturate erythrocytes with penetrating cryoprotectants (glycerol, 1,2-propane diol) the cells were incubated in the solution containing 0.15 mol/l NaCl and 5% solution of corresponding cryoprotectant for 30 min at 37°C. Erythrocytes were treated with modifiers of sulfhydryl groups according to C.W.M. Haest [9]. The cells were incubated with 15 mmol/l iodoacetamide (IAA) for 20 min, afterwards p-chloromercuribenzoate (p-CMB) under 1 mmol/l concentration was added to the suspension and incubated another 1 hr.

Hypertonic cryohemolysis was initiated in the following way: the cells were incubated in 1.2 mol/l NaCl at the temperature of 37°C for 1–60 min and then at the temperature of 0°C for 10 min. The medium where the cells were incubated during hypertonic cryohemolysis contained one of the cryoprotectants (5% glycerol, 5% 1,2-propane diol and 20% polyethylene glycol-1500 (PEG-1500)). The incubation of the cells in hypertonic medium was the 1st stage and exposure of the erythrocytes at 0°C was the 2nd stage of hypertonic cryohemolysis. Afterwards the cells were sedimented with centrifugation for 3 min at 1500 g. The content of hemoglobin in supernatant was found spectrophotometrically using SF-4A device and flow cuvette at 543 nm. Hemoglobin release out of cell was calculated in percentage vs. 100% hemolysis of erythrocytes in presence of 0.1% triton X-100 solution.

The results were statistically processed on Student-Fisher's method.

Results and discussion

Iodoacetamide (IAA) и p-chloromercuribenzoate (p-CMB) are the protein reagents interacting with SH-groups of band 3 protein [7]. Iodoacetamide is sulfhydryl acetylating reagent blocking both membrane and cytoplasmic SH-group pool [7], but not interacting with p-CMB-specific SH-group on band 3 protein chymotryptic fragment (17 kDa), located in lipid bilayer of membrane [14]. p-chloromercuribenzoate being hydrophobic and charged molecule, affects the erythrocyte membrane and destroys protein structural interactions, causes dissociation and solubilization of cytoskeleton

роцитов [7]. Так, IAA – сульфгидрильный ацетирующий реагент, блокирующий как мембранный, так и цитоплазматический пул SH-групп [7], но не взаимодействующий с р-СМВ-специфической SH-группой на 17 кДа хмотриптическом фрагменте белка полосы 3, который локализуется в липидном бислое мембраны [14]. р-СМВ, являясь гидрофобной и заряженной молекулой, при действии на мембрану эритроцитов нарушает в ней структурные взаимодействия белков, вызывает диссоциацию и солюбилизацию белков цитоскелета [12, 13]. Без предобработки клеток IAA р-СМВ не оказывает влияния на р-СМВ-специфические SH-группы и связывается с другими SH-группами, в том числе с SH-группами белка полосы 3 [7, 10, 16]. Сочетанное действие IAA и р-СМВ приводит к модификации белков полос 4.1, 4.3, 4.9, 2.1 (анкирина, связывающего спектрин с белком полосы 3) [2]. Комбинированная обработка эритроцитов человека с помощью IAA и р-СМВ приводит также к изменению конформации цитоплазматического домена белка полосы 3, вследствие которого нарушается взаимодействие этого белка с анкирином и спектринном [2]. Известно также, что р-СМВ ингибирует транспорт воды через мембрану эритроцита [6, 16].

На рис. 1 представлены данные об уровне гипертоического криогемолиза эритроцитов в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl. Установлено, что уровень гемолиза снижается с увеличением продолжительности инкубации клеток на 1-м этапе гипертоического криогемолиза (рис. 1, незакрашенные столбцы), что согласуется с данными, полученными ранее [3, 4, 8]. Предварительная модификация эритроцитов человека IAA и р-СМВ приводит к сдвигу уровня гемолиза в сторону более высоких значений и не изменяет характер зависимости гипертоического криогемолиза от продолжительности инкубации на 1-м этапе (рис. 1).

В следующей серии экспериментов вводили проникающие криопротекторы (1,2-пропандиол и глицерин) в среду, в которой клетки подвергали гипертоическому криогемолизу (рис. 2). Видно, что криопротекторы не изменяют характер временной зависимости гипертоического криогемолиза, представленной на рис. 1 и 2 (закрашенные столбцы). Следует отметить, что непродолжительная инкубация (1 мин) клеток в присутствии криопротектора на 1-м этапе гипертоического криогемолиза приводит к более высокому уровню повреждения. Как видно из рис. 2, А, модификация эритроцитов IAA и р-СМВ не приводит к изменению уровня гипертоического криогемолиза в присутствии 1,2-пропандиола при непродолжительной инкубации клеток (1–10 мин) на 1-м этапе. Однако

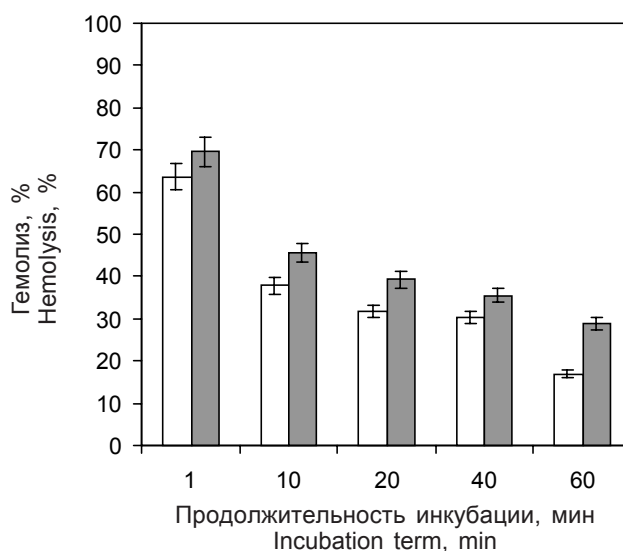


Рис. 1. Уровень гипертоического криогемолиза эритроцитов человека в зависимости от продолжительности инкубации в растворе 1,2 моль/л NaCl при 37°C: □ – немодифицированные эритроциты; ■ – эритроциты, модифицированные IAA и р-СМВ.

Fig. 1. Rate of hypertonic cryohemolysis for human erythrocytes in dependence of term of incubation in 1.2 mol/l NaCl solution at 37°C: 1 – non-modified erythrocytes; 2 – IAA and p-CMB modified erythrocytes.

proteins [12, 13]. Without IAA treatment p-CMB does not affect p-CMB-specific SH-groups, and binds with other SH-groups, including SH-groups of band 3 protein [7, 10, 16]. A combined treatment of human erythrocytes with IAA and p-CMB leads also to the change in conformation of cytoplasm domain of band 3 protein resulting in an impaired interaction of this protein with ankyrin and spectrin [2]. p-CMB is also known as inhibiting the water transport through the erythrocyte membrane [6, 16].

Fig. 1 demonstrates the data on the level of hypertonic cryohemolysis of erythrocytes in the medium, containing 1.2 mol/l NaCl. It has been established that when prolonging the incubation in hypertonic medium at the 1st stage of hypertonic cryohemolysis the rate of hemolysis reduces (Fig. 1, white columns) that corresponded to the data obtained previously [3, 4, 8]. Pre-modification of human erythrocytes with IAA and p-CMB led to the shift of cryohemolysis rate towards higher values and did not change the character of the dependence of hypertonic cryohemolysis on the duration of the incubation at the 1st stage (Fig. 1).

Next series of experiments involved the supplementing of the medium for hypertonic cryohemolysis with penetrating cryoprotectants (1,2-propane diol and glycerol) (Fig. 2). It is seen that the presence of cryoprotectants did not change the temporal character of the

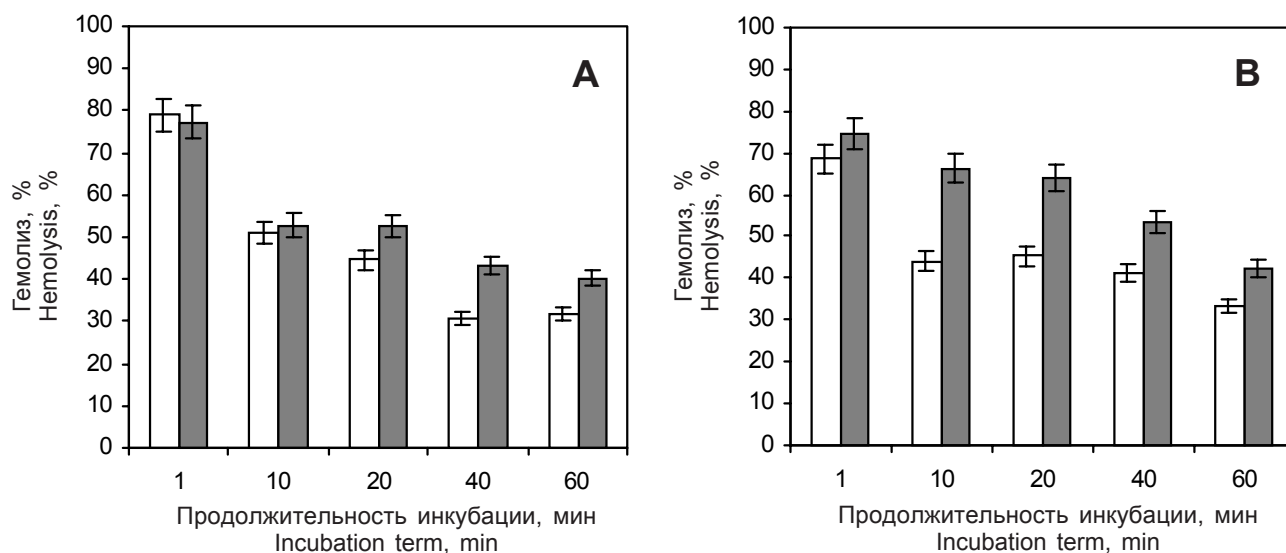


Рис. 2. Уровень гипертонического криогемолиза эритроцитов человека в зависимости от продолжительности инкубации в растворе, содержащем 1,2 моль/л NaCl при 37°C: А – 1,2-пропандиол (□ – 5% 1,2-пропандиола; ■ – 5% 1,2-пропандиола + IAA и р-СМВ); В – глицерин (□ – 5% глицерина; ■ – 5% глицерина + IAA и р-СМВ).

Fig. 2. Rate of hypertonic cryohemolysis for human erythrocytes in dependence of term of incubation in 1.2 mol/l NaCl solution at 37°C: А – 1,2-propane diol (□ – 5% 1,2-propane diol; ■ – 5% 1,2-propanediol + IAA and p-CMB); В – glycerol (□ – 5% glycerol; ■ – 5% glycerol + IAA and p-CMB).

увеличение продолжительности инкубации модифицированных эритроцитов приводит к статистически значимому повышению уровня повреждения клеток по сравнению с контрольными. В том случае, когда среда инкубации содержала глицерин (рис. 2, В), уровень гемолиза модифицированных клеток был выше по сравнению с контрольными клетками во всем временном диапазоне.

Сравнительный анализ данных, представленных на рис. 1 и 3 (незакрашенные столбцы), показывает, что присутствие в среде непроникающего криопротектора ПЭГ-1500 приводит к снижению уровня гемолитического повреждения эритроцитов на протяжении всего времени инкубации клеток на 1-м этапе. Предварительная обработка эритроцитов модификаторами цитоскелет-мембранного комплекса приводит к увеличению уровня гипертонического криогемолиза в присутствии непроникающего криопротектора (рис. 3, закрашенные столбцы). Таким образом, независимо от вида используемого криопротектора, обработка эритроцитов модификаторами цитоскелет-мембранного комплекса (IAA и р-СМВ) приводит к увеличению повреждения клеток в условиях гипертонического криогемолиза.

Многие биологические объекты повреждаются при охлаждении в изотонических условиях. Для лизиса эритроцитов млекопитающих при сдвиге температуры от 37 до 0°C необходимы гипертонические условия, которые являются сенсibiliзирующим фактором к охлаждению. Криопротек-

cryohemolysis rate in the Figs. 1 and 2 (white columns). Short-time incubation (during 1 min) of the cells in the presence of cryoprotectants at the 1st stage of hypertonic cryohemolysis did not lead to the higher rate of injury. Modification of erythrocytes with IAA and p-CMB did not increase the rate of hypertonic cryohemolysis after short-term incubation of the cells (1–10 min) at the 1st stage in the medium, containing 1,2-propane diol (Fig. 2A). However, the prolongation of incubation for modified cells results in statistically significant rise in the rate of erythrocyte injury if compared with the non-modified cells. In the case if the incubation medium contained glycerol (Fig. 2B) the hemolysis rate in modified cells was higher if compared with non-modified cells through the whole observation period.

The comparison of the data in Figs. 1 and 3 (white columns) showed that the presence of non-penetrating cryoprotectant PEO-1500 in the medium led to the lowering of the rate of hemolytic injury in the erythrocytes through the whole period of incubation at the 1st stage. Pre-treatment of erythrocytes with modifiers of cytoskeleton-membrane complex led to the increase of the rate of hypertonic cryohemolysis in the presence of non-penetrating cryoprotectant (Fig. 3, grey columns). Thus, independently of the used cryoprotectant the treatment of erythrocytes with cytoskeleton-membrane complex modifiers (IAA and p-CMB) led to the rise in cell damage rate under the hypertonic cryohemolysis conditions.

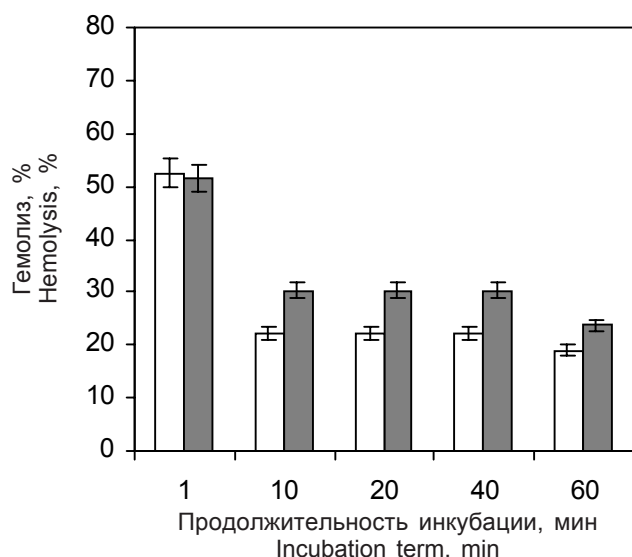


Рис. 3. Уровень гипертонического криогемолиза эритроцитов человека в зависимости от продолжительности инкубации в растворе, содержащем 1,2 моль/л NaCl при 37°C: □ – 20% ПЭГ-1500; ■ – 20% ПЭГ-1500 + IAA и p-CMB.

Fig. 3. Level of hypertonic cryohemolysis of human erythrocytes depending on incubation period in solution of 1.2 mol/l NaCl at 37°C: □ – 20% PEG-1500; ■ – 20% PEG-1500 + IAA and p-CMB.

торы, независимо от механизма их действия, позволяют снизить уровень повреждения эритроцитов при гипертоническом криогемолизе. Ранее в наших работах было показано, что присутствие в среде непроницающего криопротектора ПЭГ-1500 заметно снижает чувствительность эритроцитов человека к гипертоническому криогемолизу. В то же время использование проникающих криопротекторов (пропандиол и глицерин) приводит к снижению чувствительности клеток к гипертоническому криогемолизу на начальном этапе инкубации (до 10-й минуты) и последующему возрастанию чувствительности к указанному процессу [3]. В настоящей работе показано, что защитное действие проникающих (пропандиол, глицерин) и непроницающих криопротекторов (ПЭГ-1500), проявляющееся в снижении чувствительности эритроцитов к гипертоническому криогемолизу, нивелируется, если модифицировать цитоскелет-мембранный комплекс клеток IAA и p-CMB (рис. 2 и 3). Одним из действий p-CMB на мембрану является ингибирование транспорта воды [6]. Кроме того, известно, что эритроциты млекопитающих, характеризующиеся более низкими скоростями водного транспорта, повреждаются в большей степени при изменении осмотических и температурных условий среды [5]. Обработка эритроцитов модификаторами цитоскелет-мембранного комплекса приводит к образованию ковалентных сшивок в мембране, что делает ее более жесткой. Из вышесказанного можно предположить, что отмеченное в работе снижение эффективности криопротекторов в условиях гипертонического криогемолиза эритроцитов с модифицированным цитоскелет-мембранным комплексом может быть связано как с изменением жесткости мембраны, так и с изменением скорости транспорта воды.

Many biological objects are being damaged under cooling in isoosmotic conditions. Lysis of erythrocytes after shift of temperature from 37 down to 0°C is possible only in hypertonic conditions, being the sensibilizing additives to cooling. A cryoprotectant independently of mechanism of its action allows to decrease the rate of erythrocytes injury under hypertonic cryohemolysis conditions. It was shown earlier in our experiments, that presence of non-penetrating cryoprotectant PEO-1500 in the media decreased significantly the sensitivity of the erythrocytes to hypertonic cryohemolysis. At the same time the addition of penetrating cryoprotectants (propane diol and glycerol) resulted in the decreased sensitivity of human erythrocytes at the very start of incubation (up to the 10th min) and followed by the increased sensitivity to the mentioned process [3]. In the present research the protective action of penetrating (propane diol, glycerol) and non-penetrating (PEO-1500) cryoprotectants revealed as the lowered sensitivity of erythrocytes to hypertonic cryohemolysis was neutralized if the cytoskeleton-membrane complex of cells was modified by IAA and p-CMB (Figs. 2 and 3). One of the effects of PCMB onto the membrane is the inhibition of water transport [6]. It is known also that mammalian erythrocytes characterized by lower hydraulic conductivity are being damaged in greater extent under the alterations of osmotic and temperature conditions of medium [5]. Treatment of erythrocytes with modifiers of cytoskeleton-membrane complex leads to the covalent cross-linkage in the membrane, making it more rigid. The above mentioned facts allow to hypothesize the found in the present investigation decreased efficiency of cryoprotectants in the conditions of hypertonic cryohemolysis of erythrocytes with modified cytoskeleton-membrane complex to be associated either with changed membrane rigidity or with changed rate of water transport.

Выводы

Модификация цитоскелет-мембранного комплекса с помощью IAA и р-СМВ снижает эффективность как проникающих, так и непроникающих криопротекторов в условиях гипертонического криогемолиза эритроцитов человека.

Автор выражает благодарность с.н.с., к.б.н. Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины Рамазанову В.В. за содействие в планировании экспериментов.

Литература

1. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. – Киев: Наукова думка, 1994. – 432 с.
2. Ершов С.С. Осмотична та температурна чутливість еритроцитів ссавців: Автореф. дис... канд. біол. наук. – Харків, 2009. – 20 с.
3. Кудокотсева Е.В., Рамазанов В.В., Тимченко Л.Н. и др. Влияние модификаторов цитоскелета на структурный спектр белков цитоскелета эритроцитов человека // Проблемы криобиологии. – 1998. – №4. – С. 22–25.
4. Нардид Я.О., Даниленко Н.А., Рамазанов В.В., Бондаренко В.А. Влияние хлорида алюминия и различных криопротекторов на развитие гипертонического криогемолиза эритроцитов человека // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т. 15, №4. – С. 607–613.
5. Шпакова Н.М., Семенченко А.Ю., Бондаренко В.А. Модифицирующий эффект конканавалина-А и диамида на чувствительность эритроцитов к холодному шоку // Биохимия. – 1991. – Т. 56, №5. – С. 923–929.
6. Brahm J. Diffusional water permeability of human erythrocytes and their ghosts // J. Gen. Physiol. – 1982. – Vol. 79, №5. – P. 791–819.
7. Deuticke B. The role of membrane sulfhydryls in passive, mediated transport processes and for the barrier function of the erythrocyte membrane // Membrane biochemistry. – 1986. – Vol. 6, №4. – P. 309–326.
8. Green F.A., Jung C.Y., Cuppoletti J., Owens N. Hypertonic cryohemolysis and cytoskeletal system // Biochem. Biophys. Acta. – 1981. – Vol. 648. – P. 225–230.
9. Haest C.W.M., Kamp D., Deuticke B. Topology of membrane sulfhydryl groups in the human erythrocyte. Demonstration of a non-reactive population in intrinsic proteins // Biochem. Biophys. Acta. – 1981. – Vol. 643, №2. – P. 219–326.
10. Jarolim P., Lahav M., Liu S.C., Pale K.J. Effect hemoglobin oxidation products on the stability of red cell membrane skeletons and the associations of skeletal proteins: correlation with a release of hemin // Blood. – 1990. – Vol. 76, №10. – P. 2125–2131.
11. Kanas T., Acker J.P. Biopreservation of red blood cells – the struggle with hemoglobin oxidation // FEBS J. – 2010. – Vol. 277, №2. – P. 343–356.
12. Kuniboto M., Shibata K., Miura T. p-chlormercuribenzoate-induced dissociation of cytoskeletal protein in red blood cell of rats // Biochem. Biophys. Acta. – 1987. – Vol. 905, №2. – P. 257–267.
13. Ralston G.B., Crisp E.A. The action of organic mercurials on the erythrocyte membrane // Biochem. Biophys. Acta. – 1981. – Vol. 649, №1. – P. 98–104.
14. Ramjeesingh M., Gaarn A., Rothstein A. The locations of the three cysteine residues in the primary structure of the intrinsic

Conclusions

Thus, the modification of erythrocyte protein component with IAA and PCMB results in lowered efficiency of both penetrating and non-penetrating cryoprotectants under hypertonic cryohemolysis of human erythrocytes.

Author acknowledges V.V. Ramazanov, PhD, senior research fellow of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine for assistance during planing the experiments.

References

1. Belous A.M., Grischenko V.I. Cryobiology. – Kiev: Naukova Dumka. – 1994. – 432 p.
2. Ershov S.S. Osmotic and temperature sensitivity of mammalian erythrocytes: Author's abstract of the Thesis ... Cand. Biol. Sci. – Kharkov, 2009. – 20 p.
3. Kudokotseva E.V., Ramazanov V.V., Timchenko L.N. et al. Effect of cytoskeleton modifiers on structural spectrum of human erythrocyte cytoskeletal proteins // Problems of Cryobiology. – 1998. – N4. – P. 22–25.
4. Nardid Ya.O., Danilenko N.A., Ramazanov V.V., Bondarenko V.A. Effect of aluminum chloride and different cryoprotectants on development of hypertonic cryohemolysis of human erythrocytes // Problems of Cryobiology. – 2005. – Vol. 15, N4. – P. 607–613.
5. Shpakova N.M., Semenchenko A.Yu., Bondarenko V.A. Modifying effect of concanavalin-A and diamide on sensitivity of erythrocytes to cold shock // Biochemistry (Moscow). – 1991. – Vol. 56, N5. – P. 923–299.
6. Brahm J. Diffusional water permeability of human erythrocytes and their ghosts // J. Gen. Physiol. – 1982. – Vol. 79, №5. – P. 791–819.
7. Deuticke B. The role of membrane sulfhydryls in passive, mediated transport processes and for the barrier function of the erythrocyte membrane // Membrane biochemistry. – 1986. – Vol. 6, N4. – P. 309–326.
8. Green F.A., Jung C.Y., Cuppoletti J., Owens N. Hypertonic cryohemolysis and cytoskeletal system // Biochem. Biophys. Acta. – 1981. – Vol. 648. – P. 225–230.
9. Haest C.W.M., Kamp D., Deuticke B. Topology of membrane sulfhydryl groups in the human erythrocyte. Demonstration of a non-reactive population in intrinsic proteins // Biochem. Biophys. Acta. – 1981. – Vol. 643, N2. – P. 219–326.
10. Jarolim P., Lahav M., Liu S.C., Pale K.J. Effect hemoglobin oxidation products on the stability of red cell membrane skeletons and the associations of skeletal proteins: correlation with a release of hemin // Blood. – 1990. – Vol. 76, N10. – P. 2125–2131.
11. Kanas T., Acker J.P. Biopreservation of red blood cells – the struggle with hemoglobin oxidation // FEBS J. – 2010. – Vol. 277, N2. – P. 343–356.
12. Kuniboto M., Shibata K., Miura T. p-chlormercuribenzoate-induced dissociation of cytoskeletal protein in red blood cell of rats // Biochem. Biophys. Acta. – 1987. – Vol. 905, N2. – P. 257–267.
13. Ralston G.B., Crisp E.A. The action of organic mercurials on the erythrocyte membrane // Biochem. Biophys. Acta. – 1981. – Vol. 649, N1. – P. 98–104.
14. Ramjeesingh M., Gaarn A., Rothstein A. The locations of the three cysteine residues in the primary structure of the intrinsic

- segments of band 3 proteins, and implications concerning the arrangement of band 3 protein in the bilayer // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1983. – Vol. 729, №1. – P. 150–160.
15. *Salzer U., Zhu R., Luten M. et al.* Vesicles generated during storage of red cells are rich in the lipid raft marker stomatin // *Transfusion.* – 2008. – Vol. 48, №3. – P. 451–462.
16. *Zhang Z.H., Solomon A.K.* Effect of PCMB on anion transport in human red cell membranes // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1992. – Vol. 1106, №1. – P. 31–39.

Поступила 05.07.2011

- segments of band 3 proteins, and implications concerning the arrangement of band 3 protein in the bilayer // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1983. – Vol. 729, N1. – P. 150–160.
15. *Salzer U., Zhu R., Luten M. et al.* Vesicles generated during storage of red cells are rich in the lipid raft marker stomatin // *Transfusion.* – 2008. – Vol. 48, N3. – P. 451–462.
16. *Zhang Z.H., Solomon A.K.* Effect of PCMB on anion transport in human red cell membranes // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1992. – Vol. 1106, N1. – P. 31–39.

Accepted 05.07.2011