

Влияние ингибитора анионного транспорта DIDS на устойчивость эритроцитов к изменению осмотических и температурных параметров среды

UDC 57.043:57.042

S.V. MELIKHOVA*, E.E. NIPOT, V.A. BONDARENKO

Effect of DIDS Anion Transport Inhibitor on Erythrocyte Resistance to Change in Osmotic and Temperature Medium Parameters

Установлено, что чувствительность эритроцитов к постгипертоническому лизису (ПГЛ) зависит от состава среды дегидратации, продолжительности гипертонической инкубации и температуры среды регидратации. Ингибитор анионного транспорта DIDS оказывает выраженное защитное влияние на эритроциты в условиях ПГЛ, если среда дегидратации содержит неэлектролит. При дегидратации в электролитной среде (1,2 моль/л NaCl) защитное влияние DIDS выражено слабее и зависит от температуры среды регидратации. Предполагается, что фактором, контролирующим чувствительность эритроцитов к ПГЛ, является скорость объемных изменений эритроцитов на обоих этапах инкубации.

Ключевые слова: эритроциты, постгипертонический лизис, электролит, неэлектролит.

Установлено, що чутливість еритроцитів до постгіпертонічного лізису (ПГЛ) залежить від складу середовища дегідратації, тривалості гіпертонічної інкубації та температури середовища регідратації. Інгібітор аніонного транспорту DIDS виявляє значний захисний ефект на еритроцити в умовах ПГЛ, якщо середовище дегідратації містить неелектроліт. При дегідратації у розчині електроліту захисний вплив DIDS майже не виявляється та залежить від температури середовища регідратації. Припускається, що фактором, який контролює чутливість еритроцитів до ПГЛ, є швидкість змін об'єму клітин на обох етапах інкубації.

Ключові слова: еритроцити, постгіпертонічний лізис, електроліт, неелектроліт.

Erythrocyte sensitivity to posthypertonic lysis (PHL) was established to be dependent on dehydration medium composition, duration of hypertonic incubation and rehydration medium temperature. DIDS anion transport inhibitor causes a manifested protective effect on erythrocytes under PHL conditions when dehydration medium comprises a non-electrolyte. DIDS protective effect is slightly manifested and depends on rehydration medium temperature under dehydration in electrolyte solution. The factor, controlling erythrocyte sensitivity to PHL is assumed to be the rate of volume changes in erythrocytes at both incubation stages.

Key-words: erythrocyte, posthypertonic lysis, electrolyte, non-electrolyte.

Постгипертонический лизис (ПГЛ) эритроцитов – разрушение клеток, предварительным условием которого является их дегидратация, сопровождающаяся изменением объема и формы клеток. Такие изменения приводят к нарушению структуры цитоскелет-мембранного комплекса, что может рассматриваться как фактор, резко повышающий чувствительность клеток к последующим изменениям осмотических и температурных параметров среды [3, 5]. В условиях дегидратации структурное состояние мембраны и цитоскелета зависит от характера перераспределения ионов и воды в гипертонической среде, а также от структурных перестроек компонентов мембраны и цитоскелета [2, 3]. При регидратации ведущим фактором, определяющим устойчивость клеток к ПГЛ, является согласованность объемных изменений цитоскелета и мембраны.

Erythrocyte posthypertonic lysis is the destruction of cells, which preliminary condition is their dehydration, accompanying with a change in cell volume and shape. These changes result in a disorder of cytoskeletal-membrane complex structure, that can be envisaged as the factor, sharply increasing cell sensitivity to following changes in osmotic and temperature medium parameters [3, 5]. Under dehydration conditions a structural state of membrane and cytoskeleton depends on water and ion redistribution character in hypertonic medium, as well as on structural rearrangements of membrane and cytoskeletal components [2, 3]. The leading factor, determining cell resistance to PHL under rehydration is the coordination of volume changes of cytoskeleton and membrane.

Not only cell sensitivity to temperature and osmotic effect, but proliferative response [12], induction of

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

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

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 57 373 4135, fax: +380 57 373 3084, e-mail:cryo@online.kharkov.ua

Изменением объема клеток контролируются не только их чувствительность к температурно-осмотическому воздействию, но и пролиферативный ответ [12], индукция программируемой клеточной смерти (апоптоз, первичным признаком которого является выход K^+) [9, 13, 14]. Ингибитор анионного транспорта DIDS способен протектировать клетки от воздействия повышенной осмолярности среды, гипертонического криогемолиза [4] и предотвращать развитие апоптоза [1].

Цель работы – изучение устойчивости к ПГЛ нормальных и обработанных DIDS эритроцитов в зависимости от температурных режимов дегидратации и регидратации, а также продолжительности гипертонической инкубации клеток в электролитной среде и среде, содержащей неэлектролит.

Материалы и методы

После удаления плазмы эритромасту дважды отмывали центрифугированием при 1500 g в течение 3-х минут в 10-кратном объеме физиологического раствора (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л Трис-НСl буфер, pH 7,4) и один раз при тех же условиях, но 10 мин. Лейкоцитарную пленку удаляли аспирацией.

Чувствительность эритроцитов к ПГЛ определяли следующим образом. Аликвоты их осадка переносили в гипертонический раствор (1,2 моль/л NaCl; 0,86 моль/л сахарозы + 0,15 моль/л NaCl, pH 7,4) и инкубировали в течение 0-160 мин. Затем из каждой пробы аликвоту суспензии эритроцитов переносили в изотонический раствор (0,15 моль/л NaCl, pH 7,4) в 4-х температурных режимах: 37-37; 37-0; 0-37; 0-0°C и инкубировали 10 мин. Конечный гематокрит суспензии составлял 0,4 %.

Клетки осаждали центрифугированием в течение 3-х минут при 3000 g. Содержание гемоглобина в супернатанте определяли спектрофотометрическим способом на монохроматоре СФ-4А с проточной кюветой при длине волны 543 нм. За 100% принимали поглощение пробы, в которую добавляли тритон X-100 в концентрации 0,1%. Каждый эксперимент повторяли не менее 6 раз в двух параллельных пробах. Сохранность клеток выражали как разницу между 100%-м гемолизом и гемолизом для каждой экспериментальной точки.

При обработке клеток ингибитором анионного транспорта DIDS к суспензии эритроцитов (гематокрит 20%) добавляли DIDS в конечной концентрации 50 мкмоль/л и инкубировали на водяной бане при 37°C в течение 30 мин. Затем клетки отмывали по стандартной методике и использовали в эксперименте.

Полученные результаты обрабатывали по методу Стьюдента-Фишера.

programmable cell death (apoptosis, which primary sign is K^+ release) are controlled by a change in cell volume [9, 13, 14]. DIDS anion transport inhibitor is capable to protect cells against the effect of increased medium osmolarity, hypertonic cryohemolysis [4] and to prevent apoptosis development [1].

The research was targeted to study the PHL resistance of normal and DIDS treated erythrocytes depending on dehydration and rehydration temperature regimens, as well as on duration of hypertonic cell incubation in electrolyte medium and in that, containing non-electrolyte.

Materials and methods

After plasm removal the erythromass was twice washed-out with centrifugation at 1500 g within 3 min in a 10-fold volume of physiological solution (0.15 mol/l NaCl, 0.01 mol/l Tris-HCL buffer, pH 7.4) and once under the same conditions but for 10 min. Buffy coat layer was removed with aspiration.

Erythrocyte sensitivity to PHL was determined as follows. Aliquots of their sediment were transferred into hypertonic solution (1.2 mol/l NaCl; 0.86 mol/l sucrose+0.15 mol/l NaCl, pH 7.4) and incubated for 0-160 min. Then an aliquot of erythrocyte suspension from each sample was transferred into isotonic solution (0.15 mol/l, pH 7.4) in 4 temperature regimens: 37-37; 37-0; 0-37; 0-0°C and incubated for 10 min. Final suspension hematocrit was 0.4%.

Cells were precipitated with centrifugation for 3 min at 3000 g. Hemoglobin content in supernatant was determined spectrophotometrically using SP-4A monochromator with flow cuvette at 543 nm wavelength. We admitted for 100% the sample absorption, when triton X-100 in 0.1% concentration was added. Each experiment was repeated not less than 6 times in two parallel samples. Cell integrity was expressed as a difference between 100% hemolysis and that for each experimental point.

When treating cells with DIDS anion transport inhibitor, it was added in 50 μ mol/l final concentration into erythrocyte suspension and incubated on water bath at 37°C for 30 min. Afterwards cells were washed-out according to the standard technique and used in experiment.

The results obtained were processed with Student-Fisher method.

Results and discussion

The Fig. 1 shows the data about a change in human erythrocyte sensitivity, initially incubated in hypertonic solution (0.86 mol/l sucrose + 0.15 mol/l NaCl) to PHL. Maximum integrity is seen to be typical for cells, dehydrated at 0°C (Fig. 1, curves 3, 4). At the same time the rehydration temperature does not affect erythrocyte resistance to PHL. If the temperature of

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены данные об изменении чувствительности эритроцитов человека, исходно инкубируемых в гипертоническом растворе (0,86 моль/л сахарозы + 0,15 моль/л NaCl) к ПГЛ. Видно, что максимальная сохранность характерна для клеток, дегидратируемых при 0°C (рис.1, кривые 3,4). При этом температура регидратации не оказывает влияния на устойчивость эритроцитов к ПГЛ. Если температура гипертонического раствора составляет 37°C (рис.1, кривые 1, 2), то чувствительность клеток к регидратации в изотонической среде (0,15 моль/л NaCl) увеличивается. Более высокой чувствительностью отличаются эритроциты, регидратируемые при 0°C (рис.1, кривая 2), чем при 37°C (рис.1, кривая 1). Изменения чувствительности клеток, регидратируемых при 0 и 37°C, имеют разный характер. В режиме 37-0°C чувствительность эритроцитов к переносу в 0,15 моль/л NaCl возрастает постепенно с первых минут гипертонической инкубации, в режиме 37-37°C она начинает проявляться после 80 мин инкубации.

Замена в среде дегидратации неэлектролита на электролит (1,2 моль/л NaCl) не оказывает значительного влияния на сохранность эритроцитов, дегидратируемых при 0°C (рис. 2, кривые 3,4). В то же время для клеток, дегидратируемых при 37°C, общая тенденция изменения сохранности при переносе в режиме 37-37°C (рис. 2, кривая 1) остается неизменной, однако в режиме 37-0°C характер временной зависимости процесса изменяется (рис. 2, кривая 2), низкая сохранность эритроцитов наблюдается уже в начальный период инкубации и возрастает к ее концу.

Таким образом, как в электролитной среде, так и в среде, содержащей неэлектролит, наиболее высокая чувствительность эритроцитов к ПГЛ отмечается при изменении осмолярности в режиме 37-0°C (рис. 1, 2, кривая 2). С учетом данных работы [4] наблюдается корреляция между характером изменения сохранности эритроцитов в режимах 37-37°C и 37-0°C в электролитной среде и среде, содержащей неэлектролит (рис. 1, 2, кривые 1, 2), и уровнем выхода K⁺ при 37°C в 1,2 моль/л NaCl и 0,86 моль/л сахарозы. Видно, что в режиме 37-0°C максимальное изменение чувствительности эритроцитов отмечается в первые 40-60 мин инкубации в среде, содержащей неэлектролит (рис. 1, кривая 2), и в первые 5-10 мин – в электролитной среде (рис. 2, кривые 1, 2). В режиме 37-37°C ее максимальный рост наблюдается только в электролитной среде первые 10-20 мин (рис. 2, кривая 1). В те же промежутки времени клетки практически полностью теряют K⁺ [4]. Выход K⁺ в среде, содержащей неэлектролит

hypertonic solution is 37°C (Fig.1, curves 1, 2), cell sensitivity to rehydration in isotonic medium (0.15 mol/l NaCl) increases. More sensitive are those erythrocytes, rehydrated at 0°C (Fig. 1, curve 2), than at 37°C (curve 1). Changes in sensitivity of cells, rehydrated at 0 and 37°C have different character. In 37-0°C regimen the erythrocyte sensitivity to the transfer into 0.15 mol/l NaCl increases gradually ever since the first minutes of hypertonic incubation, as for 37-37°C one it begins manifesting after 80 min of incubation.

Substitution of non-electrolyte for electrolyte in dehydration medium (1.2 mol/l NaCl) does not significantly affect the erythrocyte integrity, dehydrated at 0°C (Fig. 2, curves 3, 4). At the same time for cells, dehydrated at 37°C a common tendency of integrity change during transfer in 37-37°C regimen (Fig. 2, curve 1) remain unchanged, but in 37-0°C one the character of time dependency of process changes. (Fig. 2, curve 2), low erythrocyte integrity is observed even at initial incubation period and increases to its end.

Thus, both in electrolyte medium and that, containing non-electrolyte the highest erythrocyte sensitivity to PHL is noted during change in osmolarity in 37-0°C regimen (Fig. 1, 2 curve 2). Taking into account the research data [4] there is observed the correlation between the character of change in erythrocyte integrity in 37-37°C and 37-0°C regimens in electrolyte medium and in that, containing non-

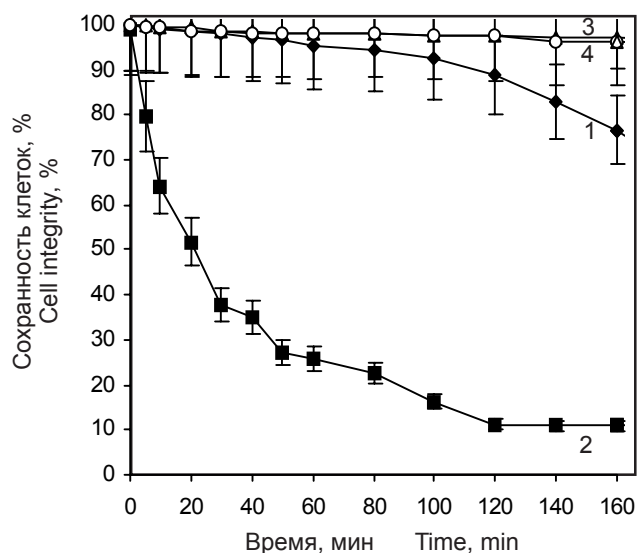


Рис. 1. Влияние продолжительности инкубации в гипертонической среде, содержащей неэлектролит, и температурных режимов переноса в 0,15 моль/л NaCl на устойчивость эритроцитов человека к ПГЛ: 1 – 37-37; 2 – 37-0; 3 – 0-37; 4 – 0-0°C.

Fig. 1. Influence of incubation duration in hypertonic non-electrolyte-containing medium and temperature regimens of transfer into 0.15 mol/l NaCl on human erythrocyte resistance to PHL: 1 – 37-37; 2 – 37-0; 3 – 0-37; 4 – 0-0°C.

(40-60 мин гипертонической инкубации), повышает чувствительность клеток к изменению температуры (см. рис. 1, кривая 2). Если температура среды регидратации не изменяется (рис. 1, кривая 1), снижение концентрации K^+ внутри клеток не оказывает значительного влияния на устойчивость эритроцитов к изменению осмотических параметров среды. В электролитной среде потеря эритроцитами катионов K^+ по мере увеличения продолжительности инкубации компенсируется поступлением Na^+ [11, 15]. Увеличение концентрации Na^+ внутри клеток препятствует дальнейшему уменьшению их объема [6] и увеличивает их сохранность в режиме 37-0°C (рис. 2, кривая 2), а также препятствует дальнейшему росту чувствительности клеток по мере увеличения продолжительности гипертонической инкубации в режиме 37-37°C (рис. 2, кривая 1).

Очевидно, основным фактором, влияющим на чувствительность эритроцитов к ПГЛ, является скорость объемных изменений клеток на этапах дегидратации и регидратации. Уменьшение скорости изменения объема клеток на этапе дегидратации за счет увеличения вязкости раствора и снижения температуры (0°C) позволяет им адаптироваться к изменяющимся условиям внеклеточной среды. В свою очередь, увеличение лабильности мембраны эритроцитов на этапе регидратации при температуре 37°C способствует замыканию возникших дефектов. Быстрое уменьшение объема на этапе дегидратации (температура 37°C) снижает адаптивные возможности эритроцитов. В этом случае снижение температуры регидратации до 0°C (режим 37-0°C) приводит к нарушению согласованности изменений в цитоскелет-мембранном комплексе на этапе возвращения к исходному объему.

Проницаемость клеток для Na^+ и K^+ контролируется трансмембранным перераспределением Cl^- посредством белка полосы 3 [10]. В связи с этим представляло интерес изучение влияния предварительной обработки клеток DIDS на развитие ПГЛ в электролитной среде и среде, содержащей неэлектролит, при различных температурных режимах.

На рис.3 отображена зависимость уровня сохранности нормальных и обработанных DIDS эритроцитов в условиях ПГЛ в среде, содержащей неэлектролит (0,86 моль/л сахарозы + 0,15 моль/л NaCl), при переносе в 0,15 моль/л NaCl в режиме 37-0°C. Как и при гипертоническом криогемоллизе [4], DIDS защищает эритроциты человека при ПГЛ (рис. 3, кривая 2). Наибольшее защитное влияние DIDS проявляется в течение первых 60 мин гипертонической инкубации при максимальном выходе K^+ [4]. Если перенос в среду регидратации осу-

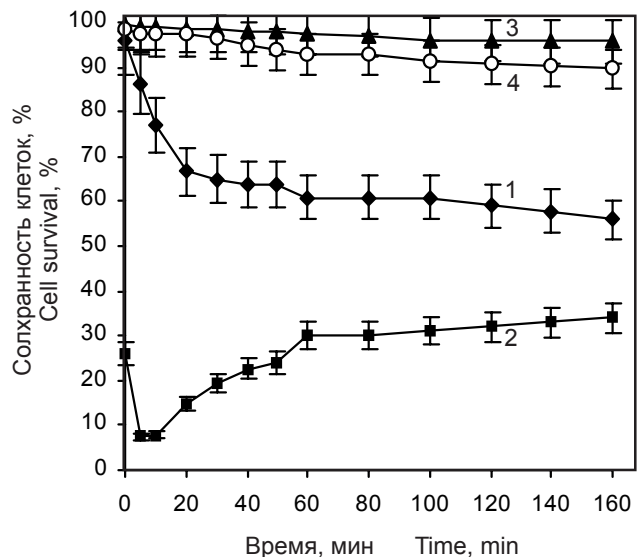


Рис. 2. Влияние продолжительности инкубации в гипертонической электролитной среде и температурных режимов переноса в 0,15 моль/л NaCl на устойчивость эритроцитов человека к ПГЛ: 1 – 37-37; 2 – 37-0; 3 – 0-37; 4 – 0-0°C.

Fig. 2. Influence of incubation duration in hypertonic electrolyte medium and temperature regimens of transfer into 0.15 mol/l NaCl on human erythrocyte resistance to PHL: 1 – 37-37; 2 – 37-0; 3 – 0-37; 0-0°C.

electrolyte (Fig. 1,2, curves 1, 2) and the level of K^+ release at 37°C in 1.2 mol/l NaCl and 0.86 mol/l sucrose. In 37-0°C regimen the maximum change in erythrocyte sensitivity is seen to be observed within the first 40-60 min of incubation in non-electrolyte containing medium (see Fig. 1, curve 2), and within the first 5-10 min into electrolyte one (Fig. 2, curves 1, 2). In 33-37°C regimen its maximum growth was observed only in electrolyte medium within the first 10-20 min (Fig. 2, curve 1). Within the same time intervals cells lose K^+ almost completely [4]. K^+ release into a non-electrolyte containing medium (40-60 min hypertonic incubation) augments cell sensitivity to temperature change (see Fig. 1, curve 2). If the temperature of rehydration medium remains unchanged (Fig. 1, curve 1) a reduction of K^+ concentration inside cells does not significantly affect erythrocyte resistance to a change in medium osmotic parameters. In electrolyte medium a loss of K^+ cations by erythrocytes with the augmentation of incubation duration is compensated by Na^+ income [11, 15]. Increase in Na^+ concentration inside cells prevents further reduction of their volume [6] and augments their integrity in 37-0°C regimen (Fig. 2, curve 2), as well as prevents further growth of cell sensitivity with augmentation of hypertonic incubation duration in 37-37°C regimen (Fig. 2, curve 1).

The rate of cell volume changes at the stages of dehydration and rehydration is apparently the main factor, affecting erythrocyte sensitivity to PHL. A

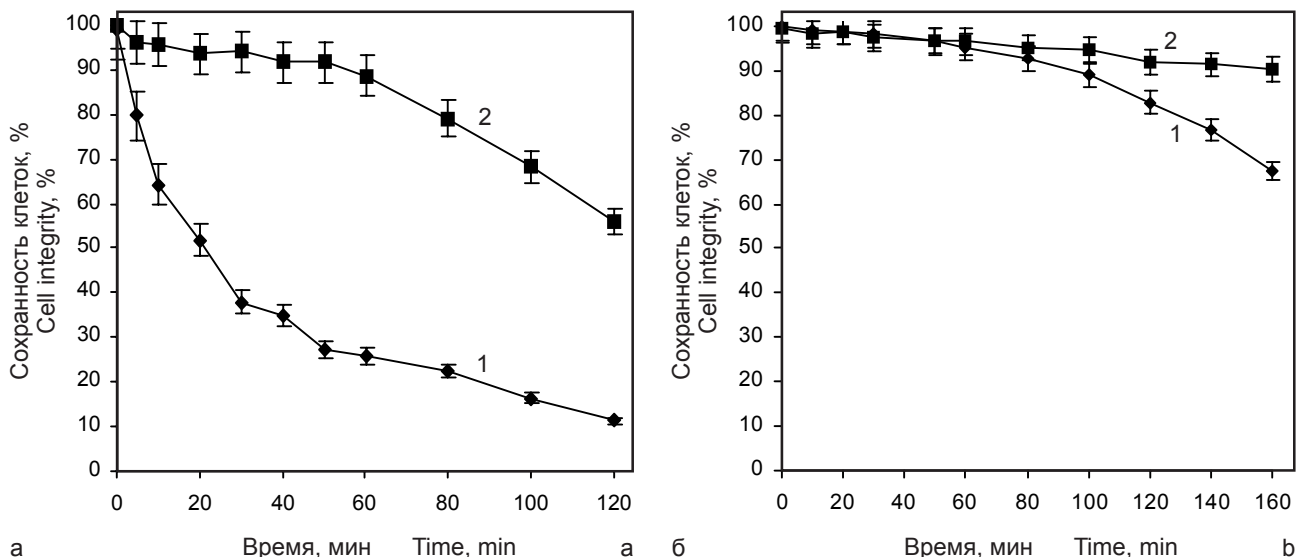


Рис. 3. Влияние продолжительности инкубации в гипертонической среде, содержащей неэлектролит, в режимах 37-0°C (а) и 37-37°C (б) нормальных (1) и обработанных DIDS (2) эритроцитов человека на устойчивость к ПГЛ.
Fig. 3. Influence of incubation duration in hypertonic non-electrolyte containing medium in 37-0°C (a) and 37-37°C (b) regimens of normal (1) and DIDS treated (2) human erythrocyte on resistance PHL

ществляется без изменения температуры (режим 37-37°C), DIDS практически полностью устраняет чувствительность эритроцитов к ПГЛ (рис. 4, кривая 2).

Аналогичные эксперименты были проведены и в электролитной среде (рис. 5, 6). Как видно из рис. 5, на начальном этапе гипертонической инкубации (20 мин) DIDS ингибирует развитие ПГЛ при переносе клеток в условия изотонии при 0°C. Однако по сравнению со средой, содержащей неэлектролит (см. рис. 3), его защитный эффект менее выражен (рис. 5). В то же время при переносе клеток без изменения температуры (режим 37-37°C, рис. 6) DIDS усиливает чувствительность эритроцитов к изменению осмотических параметров среды, особенно на более поздних этапах гипертонической инкубации.

Можно предположить, что снижение скорости перераспределения ионов через плазматическую мембрану, за счет ингибирования переносчика анионов (белка полосы 3), влияет и на скорость уменьшения объема эритроцитов на этапе дегидратации, позволяя клетке адаптироваться к изменяющимся условиям среды. Помимо блокирования перераспределения ионов между клеткой и внеклеточной средой DIDS повышает прочность связывания цитоскелета с белком полосы 3, а также вызывает диссоциацию тетрамеров белка полосы 3 на димеры, что приводит к увеличению поверхностной площади в участках контакта белка полосы 3 с липидным бислоем и усилению связывания этого белка с мембранным скелетом [7, 8]. Таким образом, в среде, содержащей неэлектролит, DIDS уменьшает степень дегидратации эритроцитов (за

decrease in change rate of cell volume at dehydration stage due to the augmentation of solution viscosity and temperature reduction (0°C) enables their adaptation to changing conditions of extracellular medium. In its turn, the augmentation of erythrocyte membrane lability at rehydration stage at 37°C contributes to closing the occurred defects. A rapid decrease in the volume at dehydration stage (37°C) reduces adaptive capabilities of erythrocytes. In this case a decrease in rehydration temperature down to 0°C (37-0°C regimen) results in a disorder in coordination of changes in cytoskeletal-membrane complex at the stage of initial volume recovery.

Cell permeability for Na⁺ and K⁺ is controlled by CL⁻ transmembrane redistribution via band 3 protein [10]. In this respect of interest was to study the effect of preliminary cell treatment with DIDS on PHL development in electrolyte medium and non-electrolyte containing one under various temperature regimens.

Fig. 3 demonstrates the dependency of integrity level of normal and DIDS-treated erythrocytes under PHL conditions in non-electrolyte containing medium (0.86 mol/l sucrose + 0.15 mol/l NaCl) when transferring into 0.15 mol/l NaCl in 37-0°C regimen. As under hypertonic cryohemolysis [4], DIDS protects human erythrocytes at PHL (Fig. 3, curve 2). The highest protective DIDS effect is manifested within the first 60 min of hypertonic incubation under maximum K⁺ release [4]. If the transfer into rehydration medium is carried-out with no changes in temperature (37-37°C regimen), DIDS eliminates erythrocyte sensitivity to PHL almost completely (Fig.4, curve 2).

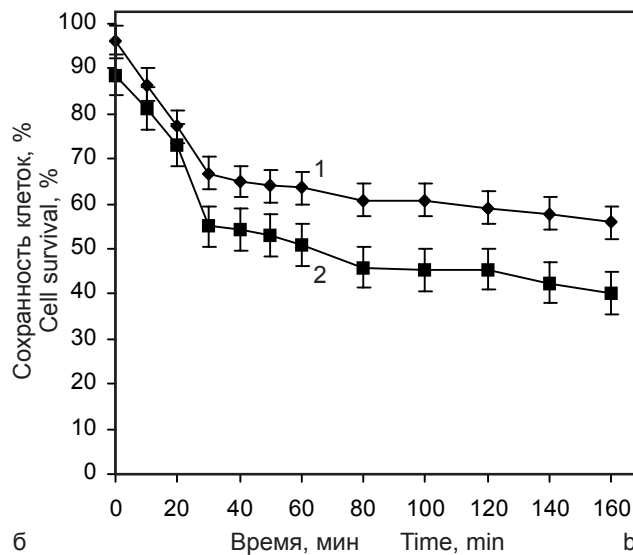
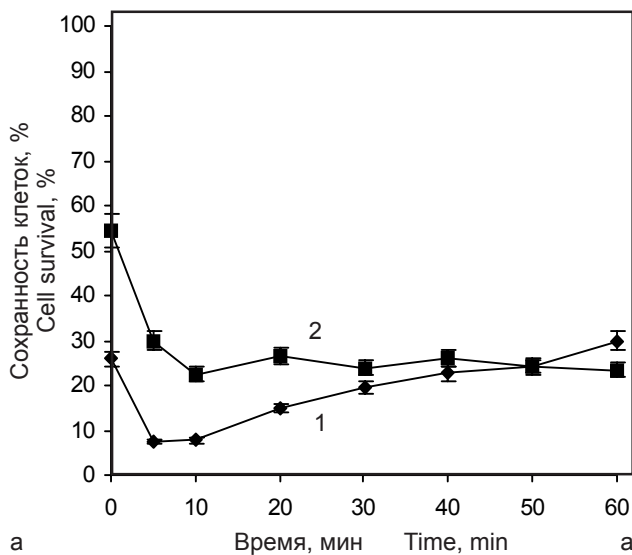


Рис. 4. Влияние продолжительности инкубации в гипертонической электролитной среде в режимах 37-0°C (а) и 37-37°C (б) нормальных (1) и обработанных DIDS (2) эритроцитов человека на устойчивость к ПГЛ.

Fig. 4. Influence of incubation duration in hypertonic electrolyte medium in 37-0°C (a) and in 37-37°C (b) regimens of normal (1) and DIDS treated (2) human erythrocyte on resistance to PHL

счет уменьшения выхода K^+ из клетки) и стабилизирует связь в пределах цитоскелет-мембранного комплекса. В электролитной среде DIDS, вероятно, не оказывает заметного влияния на перераспределение ионов [4] и опосредует свой защитный эффект на начальном этапе дегидратации в режиме 37-0°C за счет стабилизации цитоскелет-мембранного комплекса. Совокупность последних факторов, очевидно, является причиной уменьшения растяжимости мембраны эритроцита, что определяет повреждающее действие DIDS в режиме 37-37°C, когда скорость объемных изменений достаточно высокая, а концентрация Na^+ в клетках увеличена вследствие его поступления на этапе дегидратации. В режиме 37-37°C DIDS, вероятно, вызывает рассогласование скоростей восстановления объема мембраны и цитоскелета, что и является причиной его повреждающего действия на более поздних этапах дегидратации.

Выводы

Чувствительность эритроцитов к ПГЛ зависит от состава среды дегидратации, продолжительности гипертонической инкубации и температуры среды регидратации. Причем фактором, влияющим на чувствительность эритроцитов к ПГЛ, является скорость объемных изменений клеток на этапах как дегидратации, так и регидратации.

Ингибитор анионного транспорта DIDS оказывает выраженное защитное влияние на эритроциты в условиях ПГЛ в том случае, если среда дегидратации содержит неэлектролит. Когда клетки дегидратируются в электролитной среде, эффект DIDS менее выражен и зависит от температуры среды регидратации.

The similar experiments were performed in electrolyte medium as well (Fig. 5, 6). As presented in Fig. 5 at an initial stage of hypertonic incubation (20 min) DIDS inhibits PHL development when transferring cells under isotonic conditions at 0°C. However if to compare with non-electrolyte-containing medium (see Fig. 3), its protective effect is less manifested (Fig. 5). At the same time when transferring cells with no change in temperature (37-37°C regimen, Fig. 6) DIDS strengthens erythrocyte sensitivity to a change in medium osmotic parameters, especially at later stages of hypertonic incubation.

A decrease in the rate of redistribution through a plasmatic membrane via inhibition of anion carrier (band 3 protein) may be assumed to affect the rate of erythrocyte volume reduction at dehydration stage, by allowing cell to be adapted for changing medium conditions. In addition of blocking the ion redistribution between cell and intracellular medium DIDS increases the stability of cytoskeletal binding with band 3 protein, as well as causes tetramer dissociation of band 3 protein into dimers, that results in augmentation of surface area in contact sites of band 3 protein with lipid bilayer and strengthening of this protein binding with membrane skeleton [7, 8]. Thus, in the medium, containing non-electrolyte DIDS reduces the extent of erythrocyte dehydration (due to a decrease in K^+ release out of cell) and stabilises the bound within the limits of cytoskeleton-membrane complex. Probably, in electrolyte medium DIDS does not significantly affect ion redistribution [4] and intermediates its protective effect at initial state of dehydration in 37-0°C regimen due to stabilisation of cytoskeleton-membrane complex. Evidently, the totality of latter facts is the cause of a decrease in

Литература

1. *Баев Д.В., Гусарова Г.А., Сапожников А.М.* Взаимосвязь протективного эффекта ингибиторов хлорных каналов с экспрессией белков теплового шока 70 в моделях апоптоза и осмотического стресса клеток лимфомы EL-4 // Биол. мембраны.– 2002.– Т. 19, №4.– С. 275-282.
2. *Белоус А.М., Бондаренко В.А., Бабийчук Л.А., Бондаренко Т.П.* Единый механизм повреждения клеток при термальном шоке, замораживании и постгипертоническом лизисе // Криобиология.– 1985.– №2.– С. 25-32.
3. *Бондаренко В.А., Бондаренко Т.П., Руденко С.В.* Эффекты дегидратации в контроле холодной и осмотической чувствительности клеток // Пробл. криобиологии.– 1992.– №4.– С. 14-26.
4. *Рамазанов В.В.* Влияние осмотического стресса и модификаторов цитоскелета на развитие холодого и гипертонического шока эритроцитов: Дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1993.– 138 с.
5. *Руденко С.В., Бондаренко В.А.* Роль изменения объема эритроцитов в постгипертоническом лизисе // Моделирование криобиологических процессов: Сб. научн. трудов.– Харьков, 1988.– С. 55-66.
6. *Шпакова Н.М., Бондаренко В.А.* Чувствительность эритроцитов к холодовому шоку в средах, содержащих соли и неэлектролиты // Пробл. криобиологии.– 1992.– №3.– С. 15-20.
7. *Eaton J.W., Branda R.F., Hadland C., Dreher K.* Anion channel blockade: Effects upon erythrocyte membrane calcium response // Am. J. Hematol.– 1980.– Vol. 9, N4.– P. 391-399.
8. *Glaser R., Donath J.* Stationary ionic states in human red blood cells // Bioelectrochem. Bioenerg.– 1984.– Vol. 13, N1.– P.71-83.
9. *Gomez-Angelats M., Cidlowski J.A.* Cell volume control and signal transduction in apoptosis // Toxicol. Pathol.– 2002.– Vol. 30, N5.– P. 541-551.
10. *Guizouarn H., Gabillat N., Motais R., Borgese F.* Multiple transport functions of red blood cell anion exchanger, tAE1: its role in cell volume regulation // J. Physiol.– 2001.– Vol. 535, N2.– P. 497-506.
11. *Huber S.M., Gamper N., Lang F.* Chloride conductance and volume-regulatory nonselective cation conductance in human red blood cell ghosts // Pflugers Arch.– 2001.– Vol. 441, N4.– P. 551-558.
12. *Lang F., Busch G.L., Ritter M. et al.* Functional significance of cell volume regulatory mechanisms // Physiol. Rev.– 1998.– Vol. 78, N1.– P. 247-306.
13. *Lang F., Gulbins E., Szabo I. et al.* Cell volume and the regulation of apoptotic cell death // J. Mol. Recognit.– 2004.– Vol. 17, N5.– P. 473-480.
14. *Okada Y., Maeno E.* Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels // Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.– 2001.– Vol. 130, N3.– P. 377-383.
15. *Woolgar A.E.* Haemolysis of human red cells by freezing and thawing in solution containing sucrose: Relationship with posthypertonic haemolysis and solute movements // Cryobiology.– 1974.– Vol. 11, N1.– P. 44-51.

Поступила 11.04.2006

erythrocyte membrane tensibility, that determines DIDS damaging effect in 37-37°C regimen, when the rate of volume changes is quite a high and Na⁺ concentration in cells is increased due to its income at dehydration stage. In 37-37°C regimen DIDS probably causes a mismatch of recover rates of membrane and cytoskeletal volume, that is the reason of its damaging effect at later dehydration stages.

Conclusions

Erythrocyte sensitivity to PHL depends on dehydration medium composition, duration of hypertonic incubation and rehydration medium temperature. Moreover the rate of volume changes in cells both at dehydration and rehydration stages is the factor, affecting erythrocyte sensitivity to PHL.

DIDS anion transport inhibitor causes a manifested protective effect on erythrocytes under PHL conditions if dehydration medium comprises non-electrolyte. When cells are dehydrated in electrolyte medium, DIDS effect is less manifested and depends on rehydration medium temperature.

References

1. *Bayev D.V., Gusarova G.A., Sapozhnikov A.M.* Interaction between protective effect of chlorine channel inhibitors with expression of 70 heat shock proteins in models of apoptosis and osmotic stress of EL-4 lymphoma cells // Biol. Membrany.– 2002.– Vol. 19, N4.– P. 275-282.
2. *Belous A.M., Bondarenko V.A., Babijchuk L.A., Bondarenko T.P.* Common mechanism of cell damage under thermal shock, freezing and post-hypertonic lysis // Kriobiologiya.– 1985.– N2.– P. 25-32.
3. *Bondarenko V.A., Bondarenko T.P., Rudenko S.V.* Dehydration effects in controlling the cold and osmotic sensitivity of cells // Problems of Cryobiology.– 1992.– N4.– P. 14-26.
4. *Ramazanov V.V.* Influence of osmotic stress and cytoskeletal modifiers on cold and hypertonic stress development: Thesis of candidate of biol. sciences, Kharkov.– 1993.– 138 p.
5. *Rudenko S.V., Bondarenko V.A.* Role of change in erythrocyte volume in post-hypertonic lysis // Modeling of cryobiological processes: Coll. of scientific papers.– Kharkov, 1988.– P. 55-56.
6. *Shpakova N.M., Bondarenko V.A.* The sensitivity of erythrocyte to cold shock in media containing salts and nonelectrolytes // Problems of Cryobiology.– 1992.– N3.– P. 15-20.
7. *Eaton J.W., Branda R.F., Hadland C., Dreher K.* Anion channel blockade: Effects upon erythrocyte membrane calcium response // Am. J. Hematol.– 1980.– Vol. 9, N4.– P. 391-399.
8. *Glaser R., Donath J.* Stationary ionic states in human red blood cells // Bioelectrochem. Bioenerg.– 1984.– Vol. 13, N1.– P.71-83.
9. *Gomez-Angelats M., Cidlowski J.A.* Cell volume control and signal transduction in apoptosis // Toxicol. Pathol.– 2002.– Vol. 30, N5.– P. 541-551.
10. *Guizouarn H., Gabillat N., Motais R., Borgese F.* Multiple transport functions of red blood cell anion exchanger, tAE1: its role in cell volume regulation // J. Physiol.– 2001.– Vol. 535, N2.– P. 497-506.
11. *Huber S.M., Gamper N., Lang F.* Chloride conductance and volume-regulatory nonselective cation conductance in human

- red blood cell ghosts // Pflugers Arch.– 2001.– Vol. 441, N4.– P. 551-558.
12. Lang F., Busch G.L., Ritter M. et al. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms // *Physiol. Rev.*– 1998.– Vol. 78, N1.– P. 247-306.
 13. Lang F., Gulbins E., Szabo I. et al. Cell volume and the regulation of apoptotic cell death // *J. Mol. Recognit.*– 2004.– Vol. 17, N5.– P. 473-480.
 14. Okada Y., Maeno E. Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels // *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*– 2001.– Vol. 130, N3.– P. 377-383.
 15. Woolgar A.E. Haemolysis of human red cells by freezing and thawing in solution containing sucrose: Relationship with posthypertonic haemolysis and solute movements // *Cryobiology.*– 1974.– Vol. 11, N1.– P. 44-51.

Accepted in 11.04.2006