

Гипертонический криогемолиз эритроцитов млекопитающих

UDC 57.043:591.111.1

N.M. SHPAKOVA*, S.S. ERSHOV

Hypertonic Cryohemolysis of Mammalian Erythrocytes

Исследовалась чувствительность эритроцитов млекопитающих (человека, быка, лошади, собаки) к охлаждению от 37 до 0°C в гипертонических солевых средах. Полученные экспериментальные результаты показали, что гипертонический криогемолиз характерен не только для эритроцитов человека, но и для клеток быка, лошади и собаки. Эритроциты собаки, как и клетки человека, максимально повреждаются в среде, содержащей 1,2 М NaCl, а лошади – 1,4 М NaCl, в то время как для эритроцитов быка с ростом осмолярности среды (до 2,0 М NaCl) наблюдается постепенное повышение криогемолиза.

Ключевые слова: гипертонический криогемолиз, эритроциты млекопитающих.

Досліджувалась чутливість еритроцитів ссавців (людини, бика, коня, собаки) до охолодження від 37 до 0°C у гіпертонічних сольових середовищах. Отримані експериментальні результати показали, що гіпертонічний криогемолиз характерний не тільки для еритроцитів людини, але й для клітин бика, коня та собаки. Еритроцити собаки, як і клітини людини, максимально пошкоджуються у середовищі, що містить 1,2 М, а коня – 1,4 М NaCl, в той час як для еритроцитів бика зі зростанням осмолярності середовища (до 2,0 М NaCl) спостерігається поступове підвищення криогемолізу.

Ключові слова: гіпертонічний криогемолиз, еритроцити ссавців.

Sensitivity of mammalian (human, bovine, equine, canine) erythrocytes to cooling from 37 down to 0°C in hypertonic saline solutions has been studied. The obtained experimental results demonstrated hypertonic cryohemolysis as typical not only for human erythrocytes but for bovine, equine, and canine cells as well. Both canine erythrocytes and human cells are maximally damaged in the medium, containing 1.2M and 1.4M NaCl for equine ones, meanwhile for bovine erythrocytes a gradual augmentation of cryohemolysis is observed with growth in medium osmolarity (up to 2.0 M NaCl).

Key-words: hypertonic cryohemolysis, mammalian erythrocytes.

Холодовой шок – повреждение биологического материала при быстром охлаждении, характерное для многих клеток и тканей: бактерий, эмбрионов, растительных клеток и др. [11]. Для эритроцитов человека холодовой шок наблюдается при охлаждении в изотонических условиях, когда клетки предварительно обрабатываются токсинами микроорганизмов, липазами или амфифильными соединениями [4, 11], и при суспендировании клеток в гипертонической среде с последующим охлаждением [8]. В последнем случае используют термин “гипертонический криогемолиз”, чтобы подчеркнуть особенности развития холодового повреждения эритроцитов человека: сдвиг температуры в определенном диапазоне и наличие гипертонической среды, которая является фактором, вызывающим сенсibilизацию клеток к последующему охлаждению до 0°C. Следует отметить, что выявленные и описанные закономерности гипертонического криогемолиза относятся к эритроцитам человека [2, 8].

Цель данной работы – исследовать влияние осмотического стресса и охлаждения на развитие гипертонического криогемолиза эритроцитов быка, коня, собаки и сравнить с клетками человека.

Cold shock is a damage of biological material under rapid cooling, typical for many cells and tissues: bacteria, embryos, plant cells etc. [11]. For human erythrocytes cold shock is observed during cooling under isotonic conditions, where cells are preliminarily treated with toxins of microorganisms, lipases or amphiphilic compounds [4, 11] and under cell suspending in hypertonic medium with following cooling [8]. The term of “hypertonic cryohemolysis” is applied in the latter to emphasize the peculiarities of cold damage development for human erythrocytes: temperature shift within the certain range and the presence of hypertonic medium, as the factor, causing cell sensibilization to following cooling down to 0°C. Of note is that the revealed and described regularities of hypertonic cryohemolysis are related to human erythrocytes [2, 8]. This research was targeted to studying the effect of osmotic stress and cooling on hypertonic cryohemolysis development in bovine, equine and canine erythrocytes and comparing with human cells.

Materials and methods

Reagents of national production with “chemically pure” and “pure for analysis” grades were used in the work.

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

Материалы и методы

В работе использовали реактивы отечественного производства квалификации “хч” и “чда”.

Эритроциты получали из крови человека, быка, собаки, лошади (n=6), заготовленной на глицериновом консерванте. Все используемые среды готовили на 0,01M фосфатном буфере, pH 7,4.

Осмолярности растворов определяли на осмометре ОМКА 1Ц-01 (Одесса, Украина).

Для осуществления гипертонического криогемолиза эритроциты помещали в среды с соответствующей концентрацией NaCl и инкубировали при температуре 37°C в течение 10 мин (этап I), затем переносили аликвоту в раствор NaCl, охлажденный до температуры 0°C, на 10 мин (этап II). Конечный гематокрит – 0,4 %.

Чтобы вызвать гипертонический стресс эритроциты переносили в растворы, содержащие различные концентрации NaCl, при заданной температуре на 10 мин (гематокрит 0,4 %).

Количество гемоглобина в супернатанте определяли спектрофотометрически ($\lambda=543$ нм) и рассчитывали в процентах по отношению к 100%-му гемолизу эритроцитов в присутствии детергента тритона X-100 (0,1 %).

Все полученные данные представлены в виде среднего значения с указанием максимального стандартного отклонения.

Результаты и обсуждение

Эритроциты млекопитающих инкубировали при 37°C в средах, содержащих различные концентрации NaCl, а затем быстро охлаждали до 0°C без изменения тоничности внеклеточной среды. Полученные концентрационные зависимости уровня гемолиза эритроцитов человека и животных при охлаждении представлены на рис. 1.

Видно, что гипертонический криогемолиз характерен для эритроцитов не только человека (кривая 1), но и животных (кривые 2-4). Однако наряду с общими закономерностями, можно отметить и особенности развития гипертонического повреждения исследуемых эритроцитов при охлаждении. Так, гипертонический криогемолиз эритроцитов коня и собаки начинает развиваться в средах, содержащих 0,6 M NaCl, что соответствует осмолярности раствора 1200 мОсмол/кг, а клеток быка и человека – 0,8 M NaCl (1600 мОсмол/кг). По мере дальнейшего увеличения осмолярности среды повышается уровень гипертонического криогемолиза до максимальных значений, которые хорошо выражены для эритроцитов собаки, лошади и человека. Для эритроцитов быка (рис. 1) наблюдается повышение криогемолиза с ростом концентрации соли в среде. Для эритроцитов разных млекопитающих максимальный уровень повреж-

Еритроциты были получены из крови человека, быка, собаки и лошади (n=6), полученной с глицериновым консервантом. Все среды были приготовлены с 0,01M фосфатным буфером, pH 7,4. Осмолярность раствора была определена с помощью осмометра ОМКА 1С-01 (Одесса, Украина).

Для проведения гипертонического криогемолиза эритроциты помещали в среды с соответствующей концентрацией NaCl и инкубировали при 37°C в течение 10 мин (I этап), затем аликвоту переносили в раствор NaCl, охлажденный до 0°C в течение 10 мин (II этап). Конечный гематокрит составил 0,4%.

Для индукции гипертонического стресса эритроциты переносили в растворы, содержащие различные концентрации NaCl при фиксированной температуре в течение 10 мин (0,4% гематокрит).

Содержание гемоглобина в супернатанте определяли спектрофотометрически ($\lambda=543$ нм) и рассчитывали в процентах по отношению к 100% гемолизу эритроцитов в присутствии детергента тритона X-100 (0,1%).

Полученные данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения.

Results and discussion

Mammalian erythrocytes were incubated at 37°C in the media, containing different NaCl concentrations, and then rapidly cooled down to 0°C without changing tonicity of extracellular medium. Fig. 1 shows the obtained concentration dependencies of hemolysis level in human and animal erythrocytes under cooling.

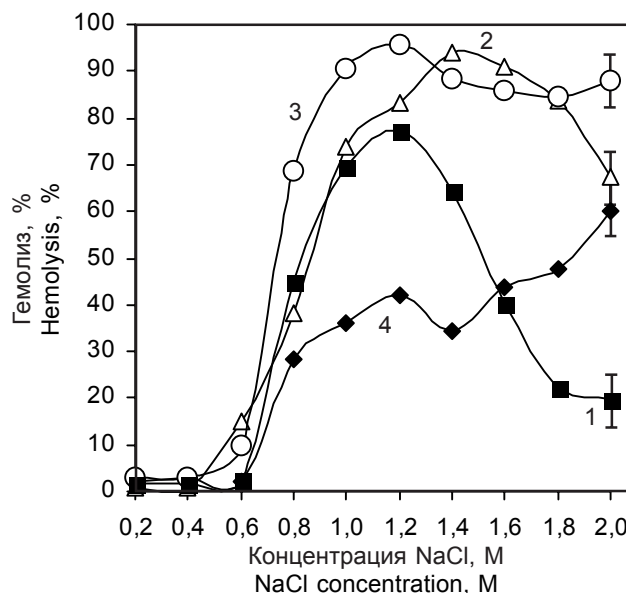


Рис.1. Зависимость от концентрации NaCl в среде уровня гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих: 1 – человека; 2 – лошади; 3 – собаки; 4 – быка.

Fig. 1. Hypertonic cryohemolysis level dependency on NaCl concentration in the medium for following mammalian erythrocytes: 1 – human; 2 – equine; 3 – canine; 4 – bovine.

дения отмечается в средах с различной осмолярностью, кроме того, значение гемолиза в точках максимального повреждения также имеет видовые различия: уровень гемолиза эритроцитов собаки и лошади на 20% выше по сравнению с клетками человека. Эритроциты собаки, как и клетки человека, имеют максимально выраженный гемолиз в среде, содержащей 1,2, а лошади – 1,4 М NaCl. Для эритроцитов человека были получены аналогичные концентрационные зависимости [1, 16], однако существовали некоторые расхождения относительно осмоляльности среды, в которой регистрировалось максимальное повреждение эритроцитов. В настоящее время большинство исследователей полагают, что в 1,2 М NaCl (2400 мОсмол/кг) эритроциты человека подвергаются наиболее выраженному повреждению [1, 5].

Для того, чтобы изучить влияние гипертонических сред на гемолиз эритроцитов млекопитающих, клетки переносили в среды, содержащие различные концентрации NaCl при температуре 37°C. Данные представлены на рис. 2.

В достаточно широком диапазоне концентраций NaCl (вплоть до 2,5 М NaCl при 37°C) клетки не повреждаются. Эритроциты быка, лошади, собаки и человека начинают лизировать (гемолиз выше 10%) в средах, содержащих NaCl в концентрации 2,50; 2,75, 3,00 и 3,00 М NaCl соответственно. Дальнейшее приращение уровня гемолиза эритроцитов млекопитающих также имеет видовые раз-

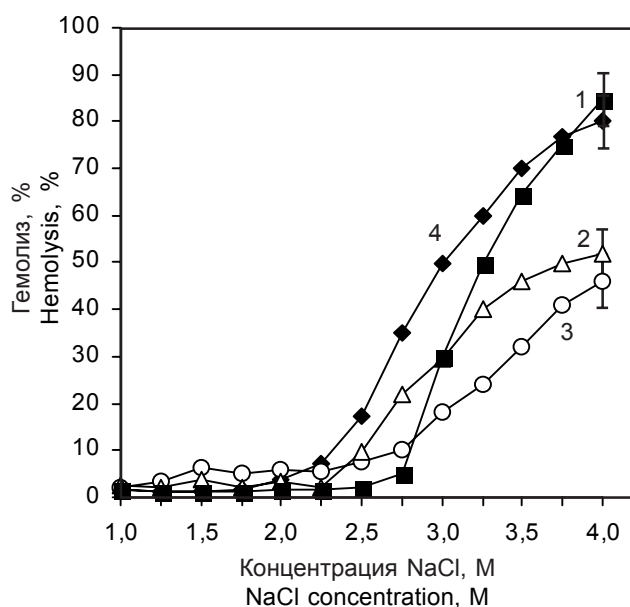


Рис. 2. Зависимость от концентрации NaCl в среде при температуре 37°C уровня гипертонического гемолиза эритроцитов млекопитающих: 1 – человека; 2 – лошади; 3 – собаки; 4 – быка.

Fig. 2. Hypertonic hemolysis level dependency on NaCl concentration in the medium at 37°C for following mammalian erythrocytes: 1 – human; 2 – equine; 3 – canine; 4 – bovine.

Hypertonic cryohemolysis is shown as typical not only for human erythrocytes (curve 1) but for animal ones (curves 2-4) as well. However along with general regularities we can also note the peculiarities of hypertonic damage development in studied erythrocytes under cooling. Thus, hypertonic cryohemolysis of equine and canine erythrocytes starts to progress in 0.6 М NaCl-containing media, that corresponds to solution osmolarity of 1200 mOsm/kg and in 0.8 М NaCl (1600 mOsm/kg) for bovine and human cells. With following increase in medium osmolarity there is the augmentation of hypertonic cryohemolysis level up to the maximum values, which are well manifested for canine, equine and human erythrocytes. For bovine erythrocytes (Fig. 1) the augmentation of cryohemolysis with salt concentration growth in the medium is observed. For erythrocytes of different mammals the maximum damage level is noted in the media with different osmolarity, in addition hemolysis level in points of maximum damage has specific differences as well: hemolysis level of canine and equine erythrocytes is 20% higher in comparison with human cells. Both canine erythrocytes and human cells have the maximally manifested hemolysis in the medium, containing 1.2 and 1.4 М NaCl for equine ones. For human erythrocytes the similar concentration dependencies were obtained [1, 16], but there were some divergences in respect of medium osmolarity, where the maximal erythrocyte damage was recorded. Nowadays many researchers believe that in 1.2 М NaCl (2400 mOsm/kg) human erythrocytes undergo the most manifested damages [1, 5].

In order to study the influence of hypertonic media on mammalian erythrocytes, the cells were transferred into the media, containing different concentrations of NaCl at 37°C. Data are presented in Fig. 2.

There are no damages in cells within quite a large range of NaCl concentrations (up to 2.5 М NaCl at 37°C). Bovine, equine, canine and human erythrocytes begin to lyse (hemolysis higher than 10%) in the media, containing NaCl in 2.50; 2.75, 3.00 and 3.00 М NaCl concentrations, correspondingly. Further increment of mammalian erythrocyte hemolysis level has also specific differences and according to this index augmentation cells can be ranged as follows: canine < equine < human. Thus, bovine and human cells are characterized with the highest sensitivity to NaCl hypertonic concentrations, meanwhile canine erythrocytes are quite resistant to hypertonic effect.

Basing on the fact, that the level of isothermal (37°C) hemolysis of mammalian erythrocytes in NaCl solutions with concentration from 1.00 to 2.25 М does not exceed 5% (Fig. 2), the contribution of spontaneous hemolysis of mammalian erythrocytes at the I stage of hypertonic cryohemolysis may be suggested as insignificant.

личия, и по увеличению этого показателя клетки можно расположить в следующий ряд: собака < лошадь < бык < человек. Таким образом, клетки быка и человека характеризуются самой высокой чувствительностью к гипертоническим концентрациям NaCl, в то время как эритроциты собаки достаточно устойчивы к гипертоническому воздействию.

Исходя из того, что уровень изотермического (37°C) гемолиза эритроцитов млекопитающих в растворах NaCl с концентрацией от 1,00 до 2,25 М не превышает 5% (рис. 2), можно полагать, что вклад спонтанного гемолиза эритроцитов млекопитающих на этапе I гипертонического криогемолиза незначителен.

Таким образом, мы показали, что для эритроцитов собаки, лошади и быка развитие гемолиза наблюдается только при совместном действии гипертонической среды (0,6-2,0 М NaCl) и сдвига температуры, что характерно и для клеток человека.

Развитие криогемолиза эритроцитов человека только в гипертонических средах связывают с высоким содержанием холестерина в их мембранах [17]. Общее молярное соотношение холестерина к фосфолипидам в эритроцитарной мембране быка и лошади составляет примерно 0,9, а собаки – 0,96, что достаточно близко к данному показателю эритроцитов человека – 0,8 [13].

Полученные результаты гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих (рис. 1) достаточно хорошо коррелируют с содержанием фосфатидилхолина (ФХ) и сфингомиелина (СМ) в их мембране (таблица). Если в мембране эритроцитов быка ФХ практически отсутствует, то в клетках собаки, лошади и человека его содержание составляет 30-50%. По мере увеличения содержания СМ во фракции фосфолипидов эритроцитарных мембран млекопитающих клетки можно расположить в ряд: бык > человек > лошадь > собака. Соотношение этих двух классов фосфолипидов (ФХ и СМ) является одним из основных факторов, определяющих текучесть мембраны. Так, для эритроцитов собаки, имеющих самое высокое соотношение указанных фосфолипидов, характерен самый высокий

Thus, we have demonstrated that for canine, equine and bovine erythrocytes the hemolysis development is observed only at joint effect of hypertonic medium (0.6-2.0 N NaCl) and temperature shift, that is typical for human cells as well.

Development of human erythrocyte cryohemolysis only in hypertonic media is associated to a high content of cholesterol in their membranes [17]. Total molar cholesterol ratio to phospholipids in bovine and equine erythrocyte membrane makes approximately 0.9 and 0.96 for canine ones, that is quite close to this index in human ones: 0.8 [13].

The results obtained for mammalian erythrocytes hypertonic cryohemolysis (Fig. 1) quite well correlate with phosphatidylcholine (PC) and sphingomyelin (SM) content in their membrane (Table). If in bovine erythrocyte membrane PC is practically absent, in canine, equine and human cells its content makes 30-50%. With an increase in SM content in phospholipid fraction of mammalian erythrocyte membrane, cells may be ranged as follows: bovine > human > equine > canine. Ratio of these two phospholipid (PC and SM) classes is one of the main factors, determining the membrane fluidity. Thus, for canine erythrocytes, having the highest ratio of mentioned phospholipids, the highest level of hypertonic cryohemolysis (95%) is typical, as for bovine cells with low PC/SM ratio the cryohemolysis level makes only 35% at 1.2M NaCl concentration.

The paper [15] demonstrates that mammalian erythrocytes with low PC/SM ratio are less damaged under cation peptide effect. The same picture we observe under hypertonic cryohemolysis as well: bovine erythrocytes are characterized with the lowest level of hypertonic cryohemolysis.

Сравнительные характеристики эритроцитов млекопитающих
Comparative characteristics of mammalian erythrocytes

Параметры сравнения Compared parameters	Эритроциты Erythrocytes			
	быка bovine	лошади equine	собаки canine	человека human
Объем эритроцита, мкм ³ [6, 12] Erythrocyte volume, μm ³ [6, 12]	50	42 – 45	70	87 (90)
Площадь эритроцита, мкм ² [6, 12] Erythrocyte area, μm ² [6, 12]	60,7	54,6	82,7	98,4
СМ,% [7, 9] SM,% [7, 9]	46,2	13,5	10,8	25,5±1,4
ФХ,% [3, 10, 14] PC,% [3, 10, 14]	Отсутствуют или очень мало Absent or slight amount	42,4 (41,3)	46,9	29,3±1,5
ФХ/СМ PC/SM	–	3,141	4,343	1,149
Общее молярное соотношение холестерина к фосфолипидам [13] Total molar cholesterol ratio to phospholipids [13]	0,92	0,92	0,96	0,8

уровень гипертонического криогемолиза (95%), для клеток быка с низким соотношением ФХ/СМ при концентрации NaCl 1,2 М уровень криогемолиза составляет всего 35%.

В работе [15] показано, что эритроциты млекопитающих с низким соотношением ФХ/СМ повреждаются меньше при действии катионных пептидов. Подобную картину видим и при гипертоническом криогемолизе: эритроциты быка характеризуются самым низким уровнем гипертонического криогемолиза.

В литературе устойчивость клеток к изменению осмотических условий среды связывают с размерами эритроцитов. В частности, эритроциты небольшого размера более устойчивы к действию гипертонических сред, чем крупные клетки [6]. Однако при гипертоническом криогемолизе, когда на клетки действуют повышенная осмолярность и охлаждение, такой корреляции не получили. Эритроциты быка, существенно уступающие по размерам клеткам собаки и человека, но соизмеримые с клетками лошади, оказались самыми устойчивыми к указанному стрессовому воздействию (рис. 1, таблица).

Выводы

Таким образом, явление гипертонического криогемолиза, ранее описанное для эритроцитов человека, характерно и для эритроцитов других млекопитающих, в частности собаки, лошади, быка. Наряду с общими чертами показаны и особенности проявления гипертонического криогемолиза эритроцитов разных видов млекопитающих, по-видимому, обусловленные спецификой строения и состава их мембран.

Литература

1. Белоус А.М., Бондаренко В.А., Бондаренко Т.П., Бабичук Л.А. Температурозависимые изменения структуры эритроцитов. Сообщение 1. Роль ионов и фазовых переходов в индукции процессов криогемолиза // Криобиология и криомедицина.– 1983.– №12.– С. 13-24.
2. Гордиенко Е.А., Коваленко С.Е. Основные закономерности явления гипертонического криогемолиза // Пробл. криобиологии.– 1997.– №3.– С. 3-7.
3. Черницкий Е.А., Воробей А.Б. Структура и функция эритроцитарных мембран.– Минск: Наука и техника, 1981.–213 с.
4. Шпакова Н.М., Бондаренко В.А. Механизм криогемолиза эритроцитов, индуцированного катионными амфипатами: синергизм индукции перехода "дискоцит-стоматокит III" при действии хлорпромазина и тоничности среды // Укр. биохим. журнал.– 1991.– Т. 60, №6.– С. 83-88.
5. Шпакова Н.М., Бондаренко В.А. Действие хлорпромазина на температурную и осмотическую чувствительность эритроцитов // Биохимия.–1991.– Т. 56, №12.– С.2125-2130.
6. Betticher D.C., Geiser J. Resistance of mammalian red blood cells of different size to hypertonic milieu // Comp. Biochem. Physiol. A.– 1989.– Vol. 93, N2.– P. 429-432.

As reported elsewhere cell resistance to a change in medium osmotic conditions is associated to erythrocyte size. In particular, small-sized erythrocytes are more resistant to the effect of hypertonic media, than the large ones [6]. However, under hypertonic cryohemolysis when cells are affected by increased osmolarity and cooling, this correlation was not obtained.

Bovine erythrocytes, being highly inferior in size to canine and human cells but comparable with equine ones, occurred to be the most resistant to the mentioned stress effect (Fig. 1, Table).

Conclusions

Thus, the phenomenon of hypertonic cryohemolysis described previously for human erythrocytes is typical for those of other mammals, in particular dog, horse and bull. Together with the common features there were demonstrated a peculiar manifestation of hypertonic cryohemolysis in different mammalian erythrocytes, apparently stipulated by specific character of structure and composition of their membranes.

References

1. Belous A.M., Bondarenko V.A., Bondarenko T.P., Babichuk L.A. Temperature-dependent changes of erythrocyte structure. Report I. Role of ions and phase transitions in cryohemolysis induction // Cryobiology and cryomedicine.– 1983.– N12.– P. 13-24.
2. Gordienko E.A., Kovalenko S.E. The main regularities of hypertonic cryohemolysis phenomenon // Problems of cryobiology.– 1997. – N 3. – P. 3-7.
3. Chernitskiy E.A. Vorobey A.B. Structure and functions of erythrocyte membranes. Minsk: Nauka i tekhnika, 1981.–213 p.
4. Shpakova N.M., Bondarenko V.A. A mechanism of cryohemolysis in erythrocytes, induced by cationic amphipaths: synergism of the "discocyte-stomatocyte III" transition induction under the effect of chlorpromazine and medium tonicity // J. Ukr. biochem.– 1991.– Vol. 60, N6.– P. 83-88.
5. Shpakova N.M., Bondarenko V.A. The action of chlorpromazine on temperature and osmotic sensitivity of erythrocytes // Biokhimiya.– 1991.– Vol. 56, N12.– P. 2125-2130.
6. Betticher D.C., Geiser J. Resistance of mammalian red blood cells of different size to hypertonic milieu // Comp. Biochem. Physiol. A.– 1989.– Vol. 93, N2.– P. 429-432.
7. Cullis P. R., de Kruijff B. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes // Biochim. Biophys. Acta.– 1979.– Vol. 559, N4.– P. 399-420.
8. Dubbelman T.V.A.R., de Bruijne A.W., Christianse K., van Steveninck J. Hypertonic cryohemolysis of human red blood cells // J. Memb. Biol.– 1979.– Vol. 50, N 3-4.– P. 225-240.
9. Engen R.L., Clark C.L. High-performance liquid chromatography determination of erythrocyte membrane phospholipid composition in several animal species // Am. J. Vet. Res.– 1990.– Vol. 51, N4.– P. 577-580.
10. Florin-Christensen J., Suarez C.E., Florin-Christensen M. et al. A unique phospholipid organization in bovine erythrocyte membranes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 2001.– Vol. 98, N14.– P. 7736-7741.
11. Morris G.J., Watson P.F. Cold shock injury – a comprehensive bibliography // CryoLetters.–1984.– Vol. 5, N6.– P. 352-372.

7. *Cullis P. R., de Kruijff B.* Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1979.— Vol. 559, N4.— P. 399-420.
8. *Dubbelman T.V.A.R., de Bruijne A.W., Christianse K., van Steveninck J.* Hypertonic cryohemolysis of human red blood cells // *J. Memb. Biol.*— 1979.— Vol. 50, N 3-4.— P. 225-240.
9. *Engen R.L., Clark C.L.* High-performance liquid chromatography determination of erythrocyte membrane phospholipid composition in several animal species // *Am. J. Vet. Res.*— 1990.— Vol. 51, N4.— P. 577-580.
10. *Florin-Christensen J., Suarez C.E., Florin-Christensen M. et al.* A unique phospholipid organization in bovine erythrocyte membranes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*— 2001.— Vol. 98, N14.— P. 7736-7741.
11. *Morris G.J., Watson P.F.* Cold shock injury — a comprehensive bibliography // *CryoLetters.*—1984.— Vol. 5, N6.— P. 352-372.
12. *Mosior M., Bialas W.A., Wrobel A., Gomulkiewicz J.* Critical cell volume and shape of bovine erythrocytes // *J. Gen. Physiol. Biophys.*— 1992.— Vol. 11, N5.— P. 499-506.
13. *Nelson G.J.* Composition of neutral lipids from erythrocytes of common mammals // *J. Lipid Researsh.*— 1967.— Vol. 8, N4.— P. 374-379.
14. *Nouri-Sorkhabi M.H., Agar N.S., Sullivan D.R. et al.* Phospholipid composition of erythrocyte membranes and plasma of mammalian blood including Australian marsupials; quantitative ³¹P NMR analysis using detergent // *Comp. Biochem. Physiol. B.*— 1996.— Vol. 113, N2.— P.221-227.
15. *Oyewale J.O.* Changes in osmotic resistance of erythrocytes of cattle, pigs, rats and rabbits during variation in temperature and pH // *Zentralbl. Veterinarmed. A.*— 1992.— Vol.39, N2.— P. 98-104.
16. *Takahashi T., Williams R.J.* Thermal shock hemolysis in human red cells. I. The effects of temperature, time and osmotic stress // *Cryobiology.*— 1983.— Vol. 20, N5.— P. 507-520.
17. *Takahashi T., Noji S., Erbe E.F. et al.* Cold shock hemolysis in human erythrocytes studied by spin probe method and freeze-fracture electron microscopy // *Biophys. J.*— 1986.— Vol. 49, N2.— P. 403-410.
12. *Mosior M., Bialas W.A., Wrobel A., Gomulkiewicz J.* Critical cell volume and shape of bovine erythrocytes // *J. Gen. Physiol. Biophys.*— 1992.— Vol. 11, N5.— P. 499-506.
13. *Nelson G.J.* Composition of neutral lipids from erythrocytes of common mammals // *J. Lipid Researsh.*— 1967.— Vol. 8, N4.— P. 374-379.
14. *Nouri-Sorkhabi M.H., Agar N.S., Sullivan D.R. et al.* Phospholipid composition of erythrocyte membranes and plasma of mammalian blood including Australian marsupials; quantitative ³¹P NMR analysis using detergent // *Comp. Biochem. Physiol. B.*— 1996.— Vol. 113, N2.— P.221-227.
15. *Oyewale J.O.* Changes in osmotic resistance of erythrocytes of cattle, pigs, rats and rabbits during variation in temperature and pH // *Zentralbl. Veterinarmed. A.*— 1992.— Vol.39, N2.— P. 98-104.
16. *Takahashi T., Williams R.J.* Thermal shock hemolysis in human red cells. I. The effects of temperature, time and osmotic stress // *Cryobiology.*— 1983.— Vol. 20, N5.— P. 507-520.
17. *Takahashi T., Noji S., Erbe E.F. et al.* Cold shock hemolysis in human erythrocytes studied by spin probe method and freeze-fracture electron microscopy // *Biophys. J.*— 1986.— Vol. 49, N2.— P. 403-410.

Accepted in 13.06.2006

Поступила 13.06.2006