

## Влияние инкубации эритроцитов в гипертонических неэлектролитных средах на их осмотическую устойчивость

UDC 57.043:612.111:612.118-544.352.4:547.458.2

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

## Effect of Erythrocytes Incubation in Hypertonic Non-Electrolyte Media on their Osmotic Resistance

Установлено, что частичная потеря клеткой  $K^+$  в результате гипертонической инкубации в 0,8-1,4 М растворе сахарозы способствует увеличению осмотической устойчивости эритроцитов к гипотоническому шоку (50 мМ раствор NaCl). Чувствительность клеток к изменению осмотических параметров среды после дегидратации в растворах неэлектролитов, содержащих валиномицин (конечная концентрация 1мМ), зависит от температуры гипертонической инкубации.

**Ключевые слова:** эритроцит, гипотонический шок, постгипертонический лизис, валиномицин, неэлектролитные среды.

Встановлено, що часткова втрата клітиною  $K^+$ , спричинена гіпертонічною інкубацією у 0,8-1,4 М розчині сахарози, сприяє зростанню осмотичної стійкості еритроцитів до гіпотонічного шоку (50 мМ розчин NaCl). Чутливість клітин до зміни осмотичних параметрів середовища дегідратації у розчинах неелектролітів, що містять валіноміцин (кінцева концентрація 1 мМ), залежить від температури гіпертонічної інкубації.

**Ключові слова:** еритроцит, гіпотонічний шок, постгіпертонічний лізис, валіноміцин, неелектролітні середовища.

Partial  $K^+$  loss by cell as a result of hypertonic incubation into 0.8-1.4 M sucrose solution has been established as contributing to an increase in erythrocyte osmotic resistance to hypotonic shock (50 mM NaCl solution). Cell sensitivity to a change in medium osmotic parameters after dehydration in valinomycin-containing non-electrolyte solutions (1mM final concentration) depends on a temperature of hypertonic incubation.

**Key-words:** erythrocytes, hypertonic shock, post-hypertonic lysis, valinomycin, non-electrolyte media

Изучение устойчивости клеток к экспонированию в гипертонических средах, содержащих соли и неэлектролиты, имеет важное значение для разработки новых методов низкотемпературного консервирования [1, 2, 6, 10]. Действие дегидратации при экспонировании клеток в гипертонической среде зависит как от продолжительности экспозиции клеток в растворах с повышенной тоничностью, так и от температуры среды [3, 7, 9]. При модификации состояния клеток в условиях дегидратации изменяется их чувствительность к восстановлению физиологических параметров среды [9]. Вторичные эффекты гипертонической дегидратации могут сильнее проявляться при переносе клеток не в изотоническую, а в гипотоническую среду, когда значительно увеличивается их объем. В этом случае осмотическая устойчивость клеток будет зависеть от процессов, происходящих в клетке на этапах гипертонической инкубации.

Цель данной работы – исследовать факторы, контролирующие чувствительность эритроцитов к изменению осмотических параметров среды.

Studying a cell resistance to exposure to the salts- and non-electrolyte- contained hypertonic solutions is of importance when elaborating new ways for low temperature preservation [1, 2, 6, 10]. Dehydration effect under cell exposure to hypertonic medium depends on either exposure duration in solution with an increased tonicity or medium temperature [3, 7, 9]. Sensitivity of cells to recovering physiological parameters of the medium changes with modifying their state under dehydration [9]. Secondary effects of hypertonic dehydration may be more manifested during cell transfer not into isotonic, but hypotonic medium when their volume significantly increases. In this case a cell osmotic resistance will depend on the processes, occurring in cell at hypertonic incubation stages.

This research was aimed to investigate the factors, controlling erythrocyte sensitivity to change in medium osmotic parameters.

### Materials and methods

Erythrocytes of human preserved blood have been used in the research. Cells were thrice washed-out with

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 экспериментах были использованы эритроциты консервированной крови человека. Клетки трижды отмывали 10-кратным объемом физиологического раствора (150 мМ NaCl, 10 мМ трис-HCl, pH 7,4) центрифугированием при 2000 g в течение 3-х минут. Плазму, лейкоцитарную пленку и надосадки удаляли методом аспирации. Упакованный осадок эритроцитов хранили при 4°C и использовали в течение 3-4-х часов.

Осмотическую устойчивость эритроцитов определяли следующим образом: 100 мкл упакованного осадка эритроцитов помещали в 1 мл гипертонического раствора сахарозы (0,8; 1; 1,2; 1,4 М сахарозы, 5 мМ фосфатного буфера, pH 7,4) или 1 мл физиологического раствора (150 мМ NaCl, 5 мМ фосфатного буфера, pH 7,4) и инкубировали при 0 или 37°C в различные промежутки времени (в ряде экспериментов гипертоническая среда содержала 1 мкМ валиномицина – специфического переносчика ионов K<sup>+</sup>). Затем аликвоту клеток (6-10 мкл) из указанных растворов переносили в 2 мл гипотонического раствора (50 мМ NaCl, 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,4) при комнатной температуре. Таким же образом измеряли и уровень постгипертонического лизиса, только клетки переносили в физиологический раствор.

Для регистрации динамики гемолиза эритроцитов была использована установка для измерения светорассеяния клеточных суспензий, созданная на базе монохроматора СФ-4А. В кювету с 2 мл изотонического раствора при постоянном перемешивании вводили 6-10 мкл суспензии клеток.

При статистической обработке результатов использовали традиционный метод определения стандартного отклонения.

## Результаты и обсуждение

Как видно из данных, представленных на рис. 1, эритроциты человека характеризуются высокой чувствительностью к переносу в гипотоническую среду (50 мМ NaCl), если их предварительно инкубируют в растворе с концентрацией 150 мМ NaCl при 0°C (кривая 1).

Иная картина наблюдается, если клетки перед переносом в гипотонический раствор инкубируют в гипертонических сахарозных средах в интервале 0,8-1,4 М (рис. 1, кривые 2-5). Чувствительность клеток к гипотоническому шоку зависит от осмолярности сахарозной среды и продолжительности инкубации в гипертонических растворах.

В условиях гипертонической инкубации при 0°C в течение 6 ч чувствительность эритроцитов к гипотоническому шоку уменьшается с увеличением осмолярности сахарозной среды. При увеличении продолжительности инкубации их чувстви-

а 10-fold volume of physiological solution (150 мМ NaCl, 10 мМ трис-HCl, pH 7.4) by 3 min centrifugation at 2000 g. Plasm, buffy coat layer and supernatants were removed using aspiration. Packed sediment of erythrocytes was stored at 4°C and used within 3-4 hrs.

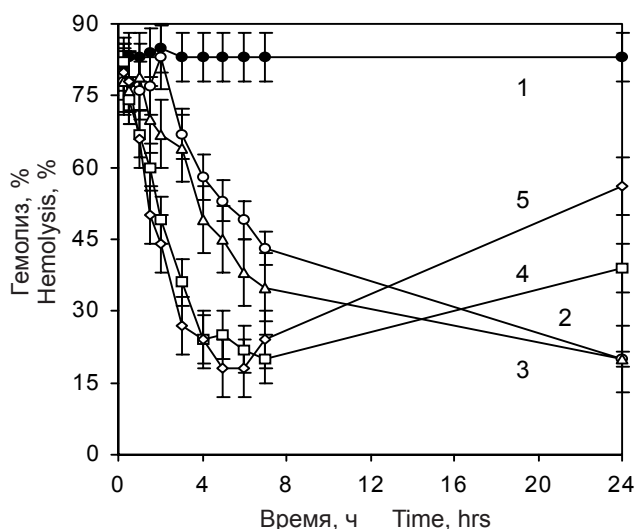
Erythrocyte osmotic resistance was determined as follows: 100 ml of packed erythrocyte sediment were placed into 1 ml sucrose hypertonic solution (0.8; 1; 1.2; 1.4 M sucrose), 5 mM phosphate buffer (pH 7.4) or 1 ml physiological solution (150 mM NaCl, 5 mM phosphate buffer, pH 7.4) and incubated at 0 or 37°C within different time intervals (in some experiments hypertonic medium contained 1mM valinomycin: specific carrier for K<sup>+</sup> ions). Then a cell aliquot (6-10 μl) was transferred out of mentioned solutions into 2 ml hypotonic solution (50 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer, pH 7.4) at room temperature. Procedure for measuring the level of post-hypertonic lysis was the same but cells were transferred into physiological solution.

Device for measuring light scattering of cell suspensions, designed at the base of CF-4A monochromator was used for recording dynamics of erythrocyte hemolysis. We introduced 6-10 μl of cell suspension into cuvette with 2 ml isotonic solution at a constant mixing.

Statistical processing was done using the standard method for determining standard deviation.

## Results and discussion

As Fig. 1 shows, human erythrocytes are characterised with a high sensitivity to transfer into hypotonic

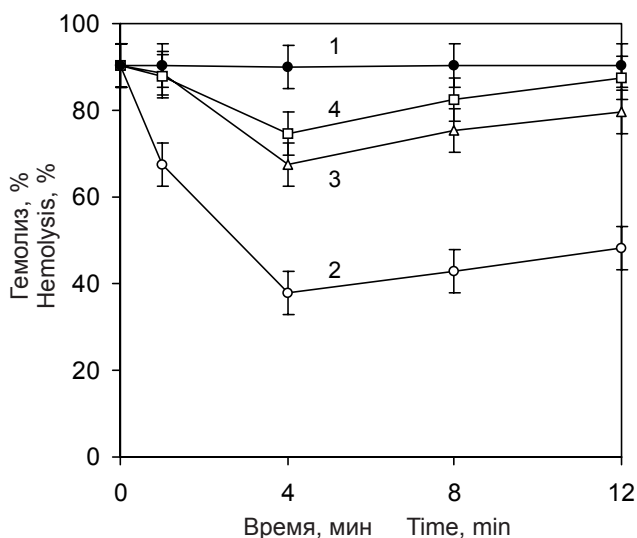


**Рис. 1.** Зависимость уровня гипотонического гемолиза эритроцитов от времени их экспозиции в растворах гипертонической сахарозы различной концентрации при 0°C: 1 – контроль; 2 – 0,8 М; 3 – 1 М; 4 – 1,2 М; 5 – 1,4 М.

**Fig. 1.** Dependency of level of erythrocyte hypotonic hemolysis on time of their exposure in hypertonic sucrose solutions with different concentration at 0°C: 1 – control; 2 – 0.8 M; 3 – 1M; 4 – 1.2 M; 5 – 1.4 M.

тельность снижается, если концентрация сахарозы в среде составляет 0,8-1,0 М (рис. 1, кривые 2, 3) и возрастает при концентрации сахарозы 1,2-1,4 М (рис. 1, кривые 4, 5). Следовательно, при длительной инкубации клеток в гипертонических условиях увеличение чувствительности клеток к гипотоническому шоку наблюдается, если они подвергаются сильному стрессу (рис. 1, кривые 4-5). Как показало параллельное тестирование таких клеток в физиологическом растворе, увеличение гемолиза для 1,2 и 1,4 М сахарозы после 7 ч инкубации связано с гипертоническим гемолизом части клеток в растворах сахарозы [4], а не с изменением чувствительности дегидратированных клеток к гипотонической обработке (данные не приведены). Таким образом, при экспозиции клеток в гипертонических растворах сахарозы при 0°C, с одной стороны, увеличивается осмотическая стабильность эритроцитов, что проявляется в возникновении устойчивости таких клеток к гипотонической обработке, с другой – часть клеток под действием гипертонии разрушается [4].

Аналогичные эксперименты были проведены при 37°C (рис. 2). Гипертоническая инкубация эритроцитов при этой температуре приводит к резкому изменению временной реакции клеток. Так, область минимального гемолиза локализуется уже в пределах первых минут инкубации, в отличие от 5-6 ч при 0°C (см. рис. 1). Это может быть обусловлено различиями в скоростях перераспределения ионов в клетках на этапе гипертонической инкубации при 37 и 0°C. Также следует отметить, что



**Рис. 2.** Зависимость уровня гипотонического гемолиза эритроцитов от времени их экспозиции в растворах гипертонической сахарозы различной концентрации при 37°C: 1 – контроль; 2 – 0,8 М; 3 – 1 М; 4 – 1,2 М.

**Fig. 2.** Dependency of level of erythrocyte hypotonic hemolysis on time of their exposure in hypertonic sucrose solutions with different concentration at 37°C: 1 – control; 2 – 0.8 M; 3 – 1M; 4 – 1.2 M.

medium (50 mM NaCl) if preliminarily incubated in solution with 150 mM NaCl concentration at 0°C (curve 1).

Another picture is observed if cells are incubated in hypertonic sucrose media within 0.9-1.4 M interval before transferring them into hypotonic solution (Fig. 1, curves 2-5). Cells sensitivity to hypotonic shock depends on sucrose medium osmolarity and incubation duration in hypertonic solutions.

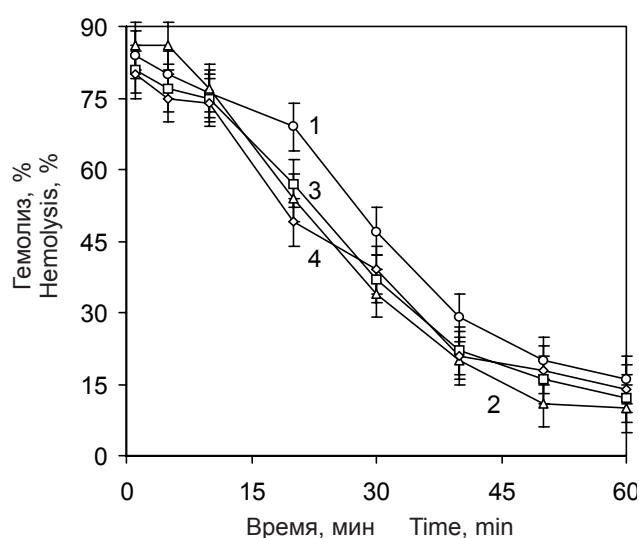
Erythrocyte sensitivity to hypotonic shock reduces with an increase in sucrose medium osmolarity under hypertonic incubation at 0°C within 6 hrs. With an increase in incubation duration their sensitivity reduces when sucrose concentration in the medium is 0.8-1.0 M (Fig. 1, curves 2, 3) and it increases at sucrose concentration of 1.2-1.4 M (Fig. 1, curves 4, 5). Consequently, at a long-term cell incubation into hypertonic conditions an increase in cell sensitivity to hypotonic shock is observed if they undergo hard stress (Fig. 1, curves 4-5). Simultaneous testing of these cells in physiological solution has demonstrated that hemolysis increase for 1.2 and 1.4 M sucrose after 7 hrs incubation is associated with hypertonic hemolysis of a part of cells in sucrose solutions [4], but not with a change in dehydrated cell sensitivity to hypotonic treatment (data are not shown). Thus, under cell exposure in sucrose hypertonic solutions at 0°C there is, on one hand, an augmentation of erythrocyte osmotic stability, manifested in appearance of these cells resistance to hypotonic treatment and, on another hand, a part of cells destroys under hypertonic effect [4].

The same experiments were carried-out at 37°C (Fig. 2). Erythrocyte hypertonic incubation at this temperature results in a sharp change of time cell response. Thus, the area of minimum hemolysis is localised even within the limits of first minutes of incubation in contrast to 5-6 hrs at 0°C (see Fig. 1). This may be stipulated with the differences in ion redistribution rates into cells at the stage of hypertonic incubation at 37 and 0°C. Of note is that at 37°C an osmotic resistance of cells is much lower than at 0°C and does not practically develop under erythrocyte incubation in 1 and 1.2 M sucrose solution. This is associated with more manifested damaging hypertonic effect on erythrocyte membrane at 37 than at 0°C. During incubation for more than 4-5 min in erythrocyte membrane there is probably appearance of the defects, resulting in irreversible damage of erythrocytes during their transfer into hypotonic conditions that is confirmed also with available posthypertonic hemolysis after 4-5 min of incubation (its level makes approximately 20% and is further growing) [4, 8]. Thus at 37°C two processes take place: during the first one under the effect of sucrose hypertonic solutions the resistance to hypotonic treatment within the first

при 37°C осмотическая устойчивость клеток выражена намного слабее, чем при 0°C, и практически не развивается при инкубации эритроцитов в 1 и 1,2 М растворе сахарозы. Видно, что это связано с более выраженным повреждающим действием гипертонии на мембрану эритроцита при 37°C, чем при 0°C. Вероятно, при инкубации клеток свыше 4-5 мин в мембране эритроцита возникают дефекты, приводящие к необратимому повреждению эритроцитов при переносе их в гипотонические условия, что подтверждается также наличием постгипертонического гемолиза после 4-5 мин инкубации (его уровень составляет примерно 20% и растет в дальнейшем) [4, 8]. Таким образом, при 37°C имеют место два процесса: первый – под действием гипертонических растворов сахарозы возникает устойчивость к гипотонической обработке в первые минуты инкубации; второй – увеличение продолжительности инкубации приводит к нарушению барьерных свойств мембраны и проявляется в уменьшении устойчивости клеток к гипотоническому шоку после 4-х минут инкубации в гипертонической среде, что связано с ростом постгипертонического гемолиза в данных условиях.

Тот факт, что при экспонировании в гипертонических растворах неэлектролитов клетка теряет большую часть  $K^+$  [5, 7], послужил основой для предположения об его участии в процессе возникновения устойчивости клеток к гипотонической обработке. Для проверки этой гипотезы клетки истощали по  $K^+$ , экспонируя их в растворах сахарозы в присутствии валиномицина. Как видно из данных рис. 3, эритроциты, обработанные валиномицином, практически теряют чувствительность к гипотоническому шоку уже в пределах одного часа гипертонической инкубации при 0°C, причем наблюдаемый эффект не зависит от осмолярности сахарозной среды. Полученные данные свидетельствуют о том, что увеличение проницаемости мембраны для  $K^+$  приводит к более быстрому повышению устойчивости клетки к гипотонической обработке.

Аналогичные эксперименты были проведены и при 37°C (данные не приведены). Установлено, что в этих условиях эритроциты не приобретают устойчивости к гипотонической обработке. Вероятно, при 37°C валиномицин значительно ускоряет перераспределение ионов  $K^+$  [5], а это является причиной дополнительного резкого объемного изменения клеток, что можно рассматривать как повреждающий фактор уже на этапе гипертонической инкубации эритроцитов. Валиномицин может оказывать повреждающее действие на мембрану эритроцитов в гипертонических условиях при 37°C.



**Рис. 3.** Зависимость уровня гипотонического гемолиза эритроцитов от времени их экспозиции в растворах гипертонической сахарозы различной концентрации при 0°C при наличии 1 мкМ валиномицина: 1 – 0,8 М; 2 – 1 М; 3 – 1,2 М; 4 – 1,4 М.

**Fig. 3.** Dependency of level of erythrocyte hypotonic hemolysis on time of their exposure in hypertonic sucrose solutions with different concentration at 0°C at the presence of 1μM valinomycin: 1 – 0.8 M; 2 – 1M; 3 – 1.2 M; 4 – 1.4 M.

incubation minutes appears, during the second one an increased incubation duration results in the disorder of barrier properties of membrane and is manifested in lessening of the cell resistance to hypotonic shock after 4 min of incubation in hypertonic medium, that is related to the growth of posthypertonic hemolysis under the given conditions.

The fact that during exposure to hypertonic solutions of non-electrolytes the cells lose a major part of  $K^+$  [5, 7] served as the base for supposing about its participation in the process of appearance of cell resistance to hypotonic treatment. To check this hypothesis the cells were exhausted on  $K^+$  by their exposure to sucrose solutions in valinomycin presence. Fig. 3 shows that erythrocytes treated with valinomycin practically lose the sensitivity to hypotonic shock even within the limits of one hour of hypertonic incubation at 0°C, moreover the observed effect does not depend on osmolarity of sucrose medium. The obtained data testify to the fact that an increase in permeability of membrane for  $K^+$  accelerates the getting of resistance to hypotonic treatment by a cell.

The same experiments were performed at 37°C (the data are not presented). It has been found that under these conditions the erythrocytes do not gain the resistance to hypotonic treatment. It means, at 37°C valinomycin significantly accelerates the redistribution of  $K^+$  ions [5] and this is the cause of additional sharp volumetric change in cells, that can be



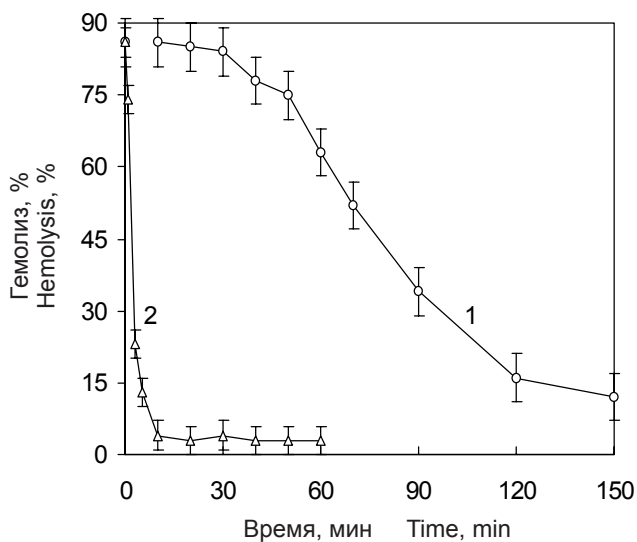
Чтобы выяснить, является ли освобождение  $K^+$  определяющим процессом в возникновении устойчивости клеток к гипотонической обработке, их экспонировали в физиологическом растворе в присутствии 1 мкМ валиномицина, после чего помещали в гипотоническую среду. Инкубация клеток с валиномицином приводит к увеличению их устойчивости к гипотонической обработке (рис. 4). При 0°C практически полная сохранность клеток в гипотонии наблюдалась после 150 мин инкубации в физиологическом растворе с валиномицином, тогда как при 37°C – после 5 мин. Если провести сравнительный анализ этих данных с данными по кинетике выхода  $K^+$  из клетки в присутствии 1 мкМ валиномицина в физиологическом растворе [5], то обнаруживается корреляция между приобретением клетками устойчивости к гипотонической обработке и выходом  $K^+$ . Следовательно, устойчивость клеток к гипотонии может зависеть от наличия  $K^+$  внутри клетки. Снижение концентрации  $K^+$  приводит к уменьшению внутриклеточной осмолярности, что, по-видимому, и определяет устойчивость эритроцитов к гипотонической обработке.

Возникает необходимость изучения изменения чувствительности клеток к постгипертоническому лизису при истощении их по  $K^+$  в гипертонических растворах сахарозы и зависимости этого процесса от температуры инкубации. Для этого клетки экспонировали в 0,8 М растворе сахарозы при на-

considered as a damaging factor even at the stage of hypertonic incubation of erythrocytes. Valinomycin may render impairing effect on membrane of erythrocytes under hypertonic conditions at 37°C.

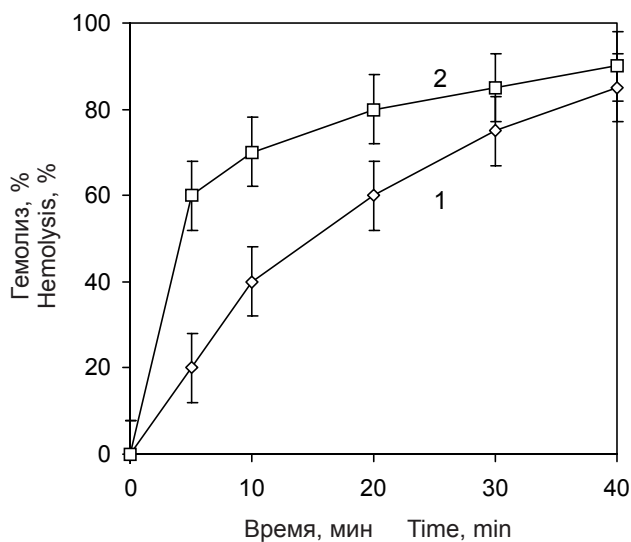
To elucidate whether  $K^+$  release is determining process in appearance of cell resistance to hypotonic treatment, they were exposed to physiological solution in the presence of 1  $\mu$ M valinomycin, afterwards there were placed into hypotonic medium. Cell incubation with valinomycin results in an increase of their resistance to hypotonic treatment (Fig. 4). At 0°C quite a complete integrity of cells to hypotony was observed after 150 min incubation in physiological solution with valinomycin, meanwhile after 5 min at 37°C. If to compare these data with those about the kinetics of  $K^+$  yield out of cells in presence of 1  $\mu$ M valinomycin in physiological solution [5], then the correlation between cells' gained resistance to hypotony treatment and  $K^+$  yield is revealed. Therefore, cell resistance to hypotony depends on the presence of  $K^+$  inside cells.  $K^+$  concentration reduction leads to a decrease in intracellular osmolarity that likely determines cell resistance to hypotonic treatment.

The necessity of studying the change in cell sensitivity to posthypertonic lysis at their exhaustion on  $K^+$  in sucrose hypertonic solutions and dependence of this process on incubation temperature appears. With this aim the cells were exposed to 0.8 M sucrose solution with and with no 1  $\mu$ M valinomycin at 37°C. Fig. 5 demonstrates that the level of posthypertonic



**Рис. 4.** Зависимость уровня гипотонического гемолиза эритроцитов от времени их экспозиции в физиологическом растворе при наличии 1 мкМ валиномицина при различных температурах: 1 – 0°C; 2 – 37°C.

**Fig. 4.** Dependency of level of erythrocyte hypotonic hemolysis on time of their exposure in physiological solution at 1  $\mu$ M valinomycin presence at different temperatures: 1 – 0°C; 2 – 37°C.



**Рис. 5.** Зависимость величины постгипертонического гемолиза эритроцитов, измеряемого при перенесении их в физиологический раствор, от времени их инкубации в 0,8 М растворе сахарозы при 37°C: 1 – без валиномицина; 2 – при наличии 1 мкМ валиномицина.

**Fig. 5.** Dependency of the value of erythrocyte posthypertonic hemolysis, measured during transferring into physiological solution, on time of their incubation into 0.8 M sucrose solutions at 37°C: 1 – free of valinomycin; 2 – in presence of 1  $\mu$ M valinomycin.

личии и отсутствии 1 мкМ валиномицина при 37°C. Как видно из данных рис. 5, уровень постгипертонического лизиса выше при наличии валиномицина, особенно в первые минуты инкубации. Аналогичный эксперимент был проведен при 0°C. Клетки экспонировали в 1,2 М растворе сахарозы при наличии и отсутствии 1 мМ валиномицина в течение 6 ч. При этом уровень постгипертонического гемолиза не отличался (данные не приведены). Можно предположить, что более высокая чувствительность эритроцитов к постгипертоническому лизису в условиях их предварительной гипертонической инкубации при 37°C вызвана дополнительными объемными изменениями клеток под действием ионофора на этом этапе. В данном случае температура (37°C) выступает как фактор, значительно ускоряющий процесс выхода калия, и, как следствие, осмотически связанной воды, что может являться одной из причин увеличения чувствительности эритроцитов к изменению осмотических параметров среды. С другой стороны, валиномицин влияет на структуру мембраны и его наличие может изменять ответ эритроцитов на температурное и осмотическое воздействие с точки зрения структурной целостности клеток. Таким образом, усиление постгипертонического гемолиза при 37°C в присутствии валиномицина может быть обусловлено повреждающим действием этого ионофора на мембранные структуры клетки. При 0°C, вероятно, валиномицин не оказывает выраженного повреждающего действия на структуру мембраны, поэтому уровень постгипертонического гемолиза как при наличии, так и отсутствии валиномицина достоверно не отличается.

### Выводы

Таким образом, увеличение устойчивости эритроцитов к переносу в условия гипотонии (50 мМ NaCl) после экспонирования в гипертоническом ряду (0,8-1,4 М) сахарозы является результатом частичной потери внутриклеточного K<sup>+</sup>, что уменьшает внутриклеточную осмолярность и приводит к тому, что клетка не достигает своего критического гемолитического объема в гипотонии.

Однако быстрое истощение клеток по калию с помощью специфического переносчика ионов калия (валиномицина) не приводит к повышению устойчивости клеток к постгипертоническому лизису, что может быть связано с резкими объемными изменениями клеток при одновременном воздействии ионофора и высокой тоничности среды инкубации, а также с повреждающим действием валиномицина на мембрану эритроцитов.

lysis is higher in valinomycin presence, especially within the first incubation minutes. The same experiment was performed at 0°C. The cells were exposed to 1.2 M sucrose solution with and with no 1mM valinomycin for 6 hr. Herewith the level of posthypertonic hemolysis did not differ (data are not presented). One may suppose that higher sensitivity of erythrocytes to post-hypertonic hemolysis under conditions of their preliminary hypertonic incubation at 37°C is caused by additional volumetric changes of cells under the effect of ionophore at this stage. In this case the temperature (37°C) acts as the factor significantly accelerating the process of potassium release and as a consequence of osmotically bound water that may be one of the causes of a rise in sensitivity of erythrocytes to the change of osmotic parameters of the medium. Valinomycin affects the membrane structure and its presence may vary the response of erythrocytes to temperature and osmotic effects from the point of view of structural integrity of cells. Thus strengthening of posthypertonic hemolysis at 37°C in presence of valinomycin can be stipulated with damaging effect of this ionophore on membrane structures of a cell. At 0°C valinomycin does not probably cause a manifested damaging effect on membrane structure and therefore the level of posthypertonic hemolysis both with and with no valinomycin does not statistically an significantly differ.

### Conclusions

An increase in erythrocyte resistance to the transfer into hypotonic conditions (50 mM NaCl) after exposure in hypertonic row (0.8-1.4 M) of sucrose is the result of partial loss of intracellular K<sup>+</sup>, that decreases intracellular osmolarity and the cell does not approach its critical hemolytical volume in hypotony.

However rapid cell exhaustion on K<sup>+</sup> with valinomycin (a specific transporter of potassium ions) does not lead to a rise in cell resistance to posthypertonic lysis that may be related to sharp volumetric changes in cells at simultaneous effect of ionophore and high tonicity of incubation medium, as well as impairing effect of valinomycin on membrane of erythrocytes.

### Reference

1. *Belous A.M., Bondarenko V.A., Babiyshuk L.A., Bondarenko T.P.* Uniform mechanism of cells damage under thermal shock, freezing and posthypertonic lysis // *Kriobiologiya.*— 1985.— N2.— P. 25-32.
2. *Bondarenko V.A., Bondarenko T.P., Rudenko S.V.* Effects of dehydration in the control of cold and osmotic cell sensitivity // *Problems of Cryobiology.*— 1992.— N4.— P. 14-26.
3. *Bondarenko T.P., Lupilova N.A.* Medium osmolarity and temperature as the factors that control erythrocyte behaviour // *Problems of Cryobiology.*— 1997.— N4.— P. 43-47.

## Литература

1. 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.
2. Бондаренко В.А., Бондаренко Т.П., Руденко С.В. Эффекты дегидратации в контроле холодовой и осмотической чувствительности клеток // Пробл. криобиологии.– 1992.– N4.– С. 14-26.
3. Бондаренко Т.П., Лупилова Н.А. Осмолярность и температура среды как факторы, контролирующие поведение эритроцитов // Пробл. криобиологии.– 1997.– N4.– С. 43-47.
4. Нипот Е.Е. Роль температуры как фактора, определяющего чувствительность эритроцитов к гипертоническому и постгипертоническому лизису // Пробл. криобиологии.– 1997.– N1-2.– С. 87-90.
5. Пересецкая Н.М. Исследование  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых транспорта калия и изменения объема в регидратированных эритроцитах человека: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1995.– 24 с.
6. Поздняков В.В., Бондаренко В.А. "Объемный сдвиг" как фактор, контролирующий осмотическую устойчивость эритроцитов в растворах низкомолекулярных криопротекторов // Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов. Сб. науч. тр.– Харьков, 1990.– С. 115-123.
7. Farrant J., Woolgar A.E. Human red cells under hypertonic conditions: a model system for investigating freezing damage 2. Sucrose // Cryobiology.– 1972.– Vol. 9, N2.– P. 16-21.
8. Minetti M., Ceccarini M., Di Stasi A.M.M. Role of membrane thermotropic properties on hypotonic hemolysis and hypertonic cryohemolysis of human red blood cells // J. Cell Biochem.– 1984.– Vol. 25, N2.– P. 61-72.
9. Pegg D.E., Diaper M.P. On the mechanism of injury to slowly frozen erythrocytes // Biophys. J.– 1988.– Vol. 54, N3.– P. 471-488.
10. Richiery A.N., Mel H.C. Temperature effects on osmotic fragility of the erythrocyte membrane // Biochim. Biophys. Acta.– 1985.– Vol 81, N3.– P. 41-50.
4. Nipot E.E. Role of temperature as the factor determining sensitivity of erythrocytes to hypertonic and posthypertonic lysis // Problems of Cryobiology.– 1997.– N1-2.– P. 87-90.
5. Peresetskaya N.M. Study of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent transport of potassium and volume changes in human rehydrated erythrocytes: Author abstract of thesis ... cand. of biol. sciences.– Kharkov, 1995.– 24 p.
6. Pozdnyakov V.V., Bondarenko V.A. "Volumetric shift" as the factor, controlling osmotic resistance of erythrocytes in low-molecular cryoprotectant solutions // Physical and chemical properties and biological action of cryoprotectants. Collection of scientific papers.– Kharkov, 1990.– P. 115-123.
7. Farrant J., Woolgar A.E. Human red cells under hypertonic conditions: a model system for investigating freezing damage 2. Sucrose // Cryobiology.– 1972.– Vol. 9, N2.– P. 16-21.
8. Minetti M., Ceccarini M., Di Stasi A.M.M. Role of membrane thermotropic properties on hypotonic hemolysis and hypertonic cryohemolysis of human red blood cells // J. Cell Biochem.– 1984.– Vol. 25, N2.– P. 61-72.
9. Pegg D.E., Diaper M.P. On the mechanism of injury to slowly frozen erythrocytes // Biophys. J.– 1988.– Vol. 54, N3.– P. 471-488.
10. Richiery A.N., Mel H.C. Temperature effects on osmotic fragility of the erythrocyte membrane // Biochim. Biophys. Acta.– 1985.– Vol 81, N3.– P. 41-50

*Accepted in 20.09.2005*

*Поступила 20.09.2005*