УДК 57.043:591.111.1:612.118

ОСМОТИЧНИЙ І ТЕМПЕРАТУРНИЙ СТРЕС ЕРИТРОЦИТІВ РІЗНИХ ВИДІВ ССАВЦІВ

Н. М. Шпакова

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Проведено порівняльне дослідження чутливості еритроцитів різних видів ссавців (людина, кінь, бик, собака) до зміни осмотичних і температурних умов середовища. При 37 °С висока чутливість до дії 4,0 М NaCl характерна для клітин людини і бика, при 0 °С — людини і собаки. Еритроцити коня та бика легко пошкоджуються в умовах гіпотонічного стресу при 37 і 0 °С, але достатньо стійкі до дії гіпертонічного середовища (4,0 М NaCl, 0 °С). В умовах холодового шоку найбільша стійкість відмічена для еритроцитів бика. Одержані результати обговорюються з позиції структурно-функціональних особливостей еритроцитів різних видів ссавців.

Ключові слова: ЕРИТРОЦИТИ ЛЮДИНИ, БИКА, КОНЯ, СОБАКИ, ГІПЕРТОНІЧНИЙ СТРЕС, ГІПОТОНІЧНИЙ ЛІЗИС, ХОЛОДОВОЙ ШОК, ЕРИТРОЦИТАРНІ МЕМБРАНИ, ТЕМПЕРАТУРА СЕРЕДОВИЩА

Еритроцити ссавців перебувають у кровоносному руслі при певних значеннях параметрів позаклітинного середовища, наприклад, осмотичного і онкотичного тиску, іонної сили, pH. Клітини мають необхідний запас міцності для адаптації до змін умов навколишнього середовища. Наприклад, еритроцити здатні витримати істотний перепад осмотичного тиску при проходженні через мозкову речовину нирок [1]. Проте при критичному значенні якого-небудь параметра клітини не можуть пристосуватися і лізують. Зокрема, різке зниження і підвищення осмотичного тиску позаклітинного розчину можуть призвести до порушення бар'єрних властивостей еритроцитів та їх загибелі [2, 3]. При заморожуванні еритроцитів з метою їх тривалого зберігання клітини піддаються одночасній дії чинників кріопошкодження, серед яких важлива роль відводиться високій осмолярності розчину, обумовленої виморожуванням води. При розморожуванні клітинної суспензії відбувається різке зниження осмолярності позаклітинного середовища, яке також призводить до руйнування еритроцитів [2].

До теперішнього часу реакція еритроцитів людини на гіпо- і гіпертонічне середовище, а також на охолодження у зоні позитивних температур у гіпертонічних умовах, так званий холодовой шок, досліджена на макро- і мікрорівнях [2–4]. Еритроцити тварин з різним якісно-кількісним складом еритроцитарних мембран і цитоплазми [5–7] вивчені в цьому аспекті недостатньо. Еритроцити ссавців, що характеризуються багатьма загальними рисами будови еритроцитарної мембрани і протікання біохімічних реакцій, можуть відрізнятися не тільки складом білкового і ліпідного компонентів мембрани [6–8], але й особливостями гомеостазу клітин [5]. Так, еритроцити людини, бика, коня і собаки мають різні розміри клітин, а саме діапазон варіювання такого параметра, як відношення площі поверхні клітини до її об'єму, складає для них 1,50–1,95 [9, 10]. Для зазначених еритроцитів є характерним неоднаковий вміст внутрішньоклітинної води [5], їхні мембрани розрізняються за вмістом сфінгомієліну (СФМ) і холестерину [7] і за проникністю для води [11, 12]. Еритроцити ссавців — зручна модель для порівняльного вивчення дії осмотичного і температурного чинників на клітини, які мають певні структурно-функціональні особливості. Існує

припущення, що ці особливості еритроцитів різних видів ссавців можуть обумовлювати різну реакцію клітин на дію фізико-хімічних факторів середовища.

У зв'язку з вищевикладеним мета роботи полягає у порівняльному дослідженні чутливості еритроцитів різних видів ссавців (людини, коня, собаки, бика) до дії гіпотонічного і гіпертонічного стресу (37 і 0 °С), а також холодового шоку.

Матеріали і методи

Еритроцити отримували з крові людини, бика, собаки, коня (n=6), заготовленої на глюгицировому консерванті. Середовища готували на 0,01 М фосфатному буфері, pH 7,4. Осмолярність розчинів визначали на осмометрі ОМКА 1Ц-01 (Одеса, Україна).

Для здійснення гіпотонічного стресу еритроцити переносили у розчин, що містить NaCl у концентрації від 40 до 120 мМ при температурі 37 або 0 °С та інкубували протягом 5 хв (гематокрит 0,4 %).

Щоб викликати гіпертонічний стрес, еритроцити переносили у розчини з різними концентраціями NaCl (від 1,0 до 4,0 М NaCl) при температурі 37 або 0 °С на 10 хв (гематокрит 0,4 %).

Для здійснення холодового шоку еритроцити переносили у середовище з різними концентраціями NaCl та інкубували при температурі 37 °С протягом 10 хв (етап I), потім аліквоту переносили на 10 хв у розчин NaCl тієї же осмолярності, охолоджений до температури 0 °С (етап II). Кінцевий гематокрит — 0,4 %.

Після інкубації клітини центрифугували і спектрофотометрично визначали кількість гемоглобіну у супернатанті при довжині хвилі 543 нм. Вихід гемоглобіну з клітин розраховували у відсотках відносно до 100 %-го гемолізу еритроцитів у присутності тритону Х-100 (0,1 %).

У роботі використані реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації «хч» і «чда».

Експериментальні результати наведено як середнє арифметичне ± стандартна похибка середнього. n — кількість тварин, наведено в підписах до рисунків. Аналіз результатів проведено за допомогою критеріїв Манна-Уїтні. Розходження між групами вважали статистично вірогідними при $P < 0,05$.

Результати й обговорення

На рисунку 1 представлені залежності гіпотонічного гемолізу еритроцитів різних видів ссавців від концентрації NaCl у середовищі при температурі 37 (а) і 0 °С (б). В цілому при 37 °С залежності мають однаковий характер для всіх еритроцитів, проте встановлені деякі видові особливості. Еритроцити коня і бика починають лізувати раніше (тобто у середовищі з вищими значеннями осмолярності), ніж клітини людини і собаки. У середовищі, яке містить 40 мМ NaCl (осмолярністіь 80 мОсмоль/кг), максимальний рівень ушкодження спостерігається для еритроцитів коня і бика, мінімальний — для собаки. Цей факт, що еритроцити собаки лізують у достатньо широкому концентраційному діапазоні NaCl, свідчить про їх значну гетерогенність у чутливості до гіпотонічного середовища, тоді як для еритроцитів людини характерна найбільша синхронність гіпотонічного пошкодження.

При температурі 0 °С (рис. 1 б) у середовищі з концентрацією NaCl 50 мМ максимальне пошкодження спостерігається не лише для еритроцитів коня, бика, але й людини. Найбільша стійкість до гіпотонічного лізису характерна для клітин собаки.

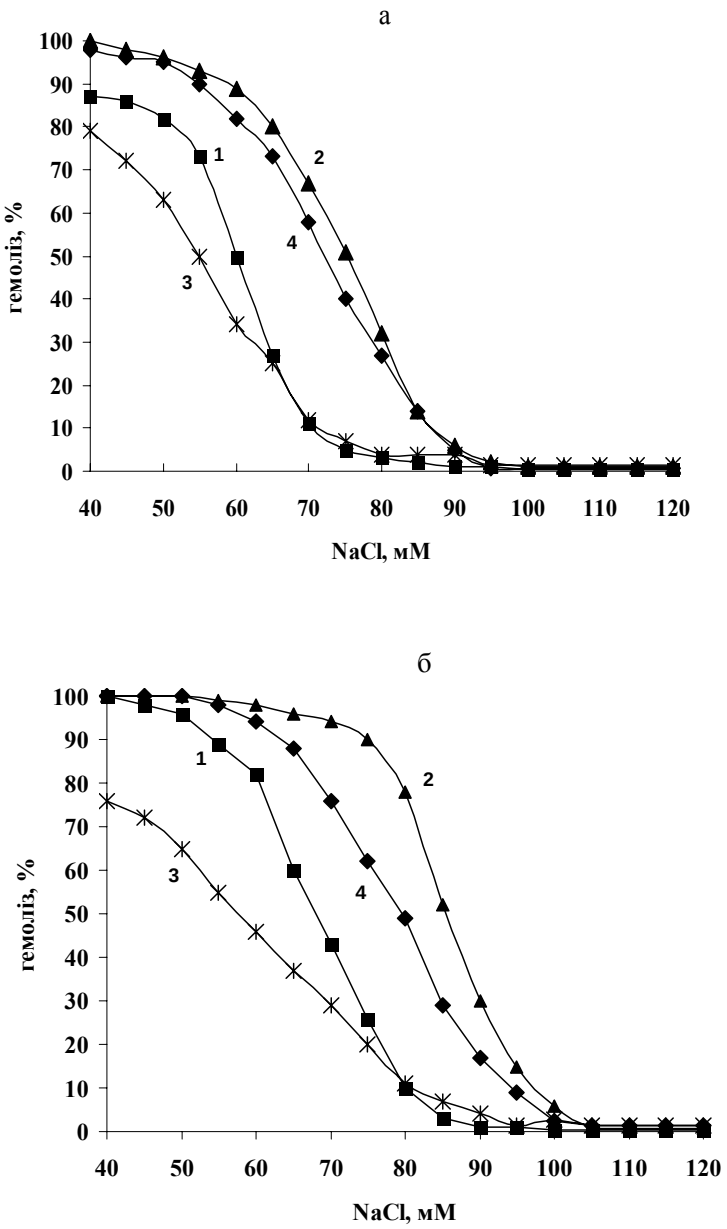
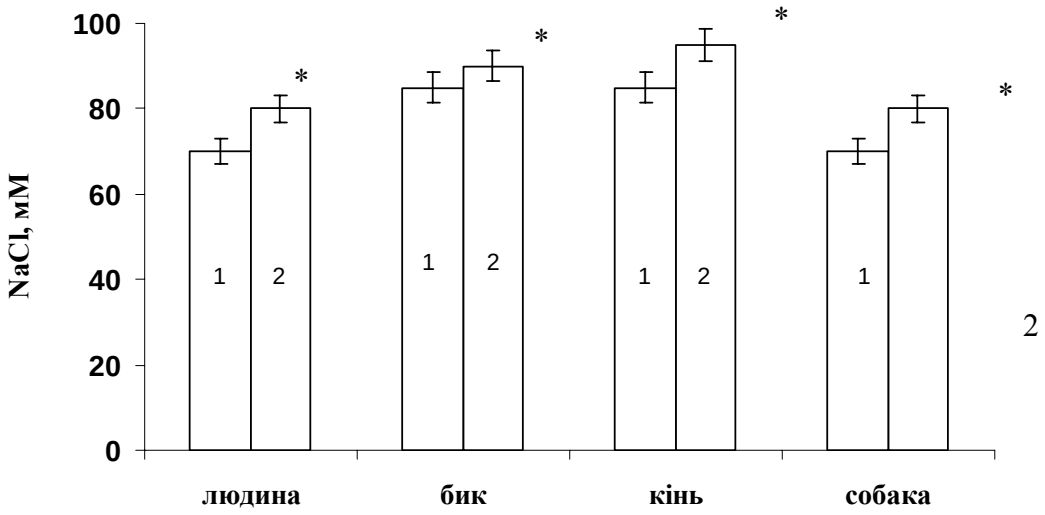


Рис. 1. Гіпотонічний гемоліз еритроцитів ссавців при температурі 37 (а) і 0 °С (б):
1 — людина; 2 — кінь; 3 — собака; 4 — бик (n=7)

З концентраційних залежностей гіпотонічного гемолізу еритроцитів ссавців при 37 і 0 °С (рис. 1) були визначені порогові концентрації солі (концентрації NaCl, при яких спостерігається 10 % гемоліз еритроцитів) і значення індексів осмотичної крихкості (концентрації NaCl, при яких спостерігається приблизно 50 % пошкодження клітинної суспензії) (рис. 2). Встановлено, що при низькій температурі ці показники зрушуються у бік вищих концентрацій NaCl для еритроцитів всіх видів ссавців (за винятком клітин собаки, для яких індекс осмотичної крихкості взагалі не залежить від температури). Отже, гіпотонічна чутливість еритроцитів ссавців підвищується при зниженні температури, про що свідчать дані роботи [13]. Таким чином, клітини різних видів ссавців легше переносять гіпотонічне навантаження при 37 °С.

а



2

б

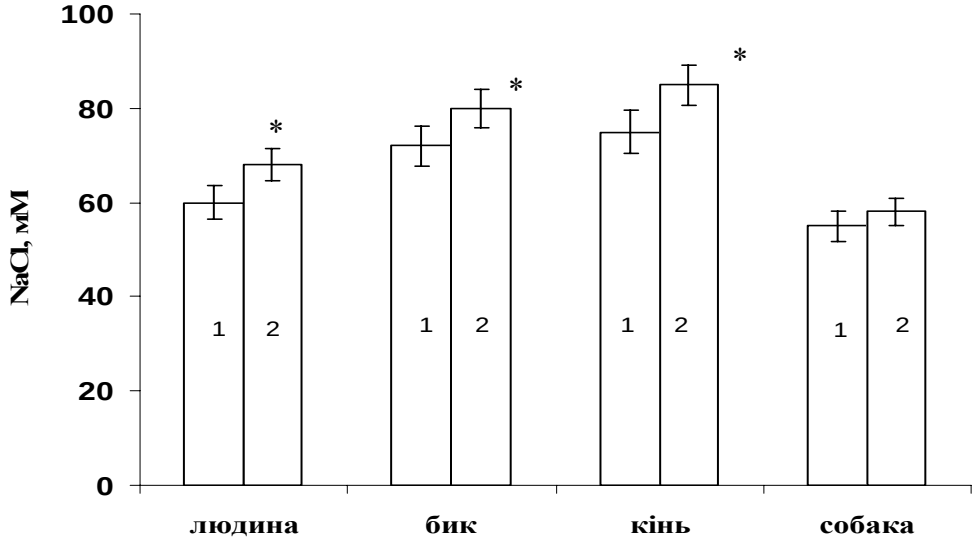


Рис. 2. Значення порогових концентрацій (а) та індексів осмотичної крихкості (б) еритроцитів ссавців при гіпотонічному гемолізі при 37 і 0 °С (n=7).
Примітка: * — вірогідно відрізняється в порівнянні з 37 °С, P_u<0,05

У гіпотонічному середовищі еритроцити гемолізують, оскільки клітини набухають у результаті входу води, внаслідок чого мембрана піддається ізотропному розтягуванню, клітини збільшуються в об'ємі і руйнуються. Існує два уявлення про розвиток гіпотонічного пошкодження еритроцитів людини. Перше уявлення ґрунтується на тому, що для гіпотонічного лізису необхідні достатньо малі тимчасові відрізки, а еритроцитарні мембрани мають досить високу проникність для води [14], тому саме транспорт води визначає швидкість наростання у мембранах розтягуючої тангенціальної напруги і, отже, момент їх

розриву, тобто гемоліз [15]. Проте наші результати не узгоджуються з цим уявленням. Аналіз дифузійної та осмотичної проникності мембран для води еритроцитів різних видів ссавців [11, 12] свідчить, що найбільш стійкі до дії гіпотонічного середовища клітини собаки (рис. 1–2) мають найвищі значення осмотичного і дифузійного водного транспорту у порівнянні з іншими ссавцями. Так, осмотична водна проникність (P_f) еритроцитів собаки складає 0,027 см/с, тоді як для людини — 0,02 см/с, бика — 0,016 см/с, коня — 0,012 см/с [12], а дифузійна проникність (Pd) еритроцитів собаки при 37 °С дорівнює ~$8*10^{-3}$ см/с, а людини і бика — ~$7*10^{-3}$ см/с і ~$5*10^{-3}$ см/с відповідно [11].

Згідно з іншим уявленням, яке засновано на мікроскопічних дослідженнях, час для розвитку гемолітичного процесу у гіпотонічному середовищі безпосередньо не пов'язаний з часом досягнення клітинами об'єму, при якому починається гемоліз [3], а визначається етапом, пов'язаним із формуванням у мембрані макроскопічної пори. Вихід гемоглобіну з еритроцитів відбувається не миттєво, а протягом тривалого часу. У нашому випадку, напевно, характеристики водного транспорту еритроцитів ссавців важливі на етапі набухання клітин до значення критичного гемолітичного об'єму, а на етапі формування макроскопічної пори — деякі інші особливості еритроцитів різних видів ссавців. Таким чином, при гіпотонічному гемолізі визначальним є етап, пов'язаний із формуванням у мембрані макроскопічної пори, а не швидкість досягнення клітинами критичного гемолітичного об'єму

Збільшення гіпотонічного пошкодження еритроцитів всіх ссавців при зниженні температури інкубаційного середовища до 0 °С (рис. 1–2) може бути обумовлено не тільки низькою вірогідністю замикання гіпотонічної пори при 0 °С у порівнянні з 37 °С [16], але і температурною залежністю критичного гемолітичного об'єму еритроцитів: при 4 °С значення критичного гемолітичного об'єму нижче приблизно на 8 %, ніж при 20 °С [17].

Для вивчення впливу гіпертонічних середовищ на гемоліз еритроцитів ссавців клітини переносили у розчини з різними концентраціями NaCl при температурі 37 °С (рис. 3). У достатньо широкому діапазоні концентрацій NaCl (до 2,5 М NaCl при 37 °С) клітини не пошкоджуються.

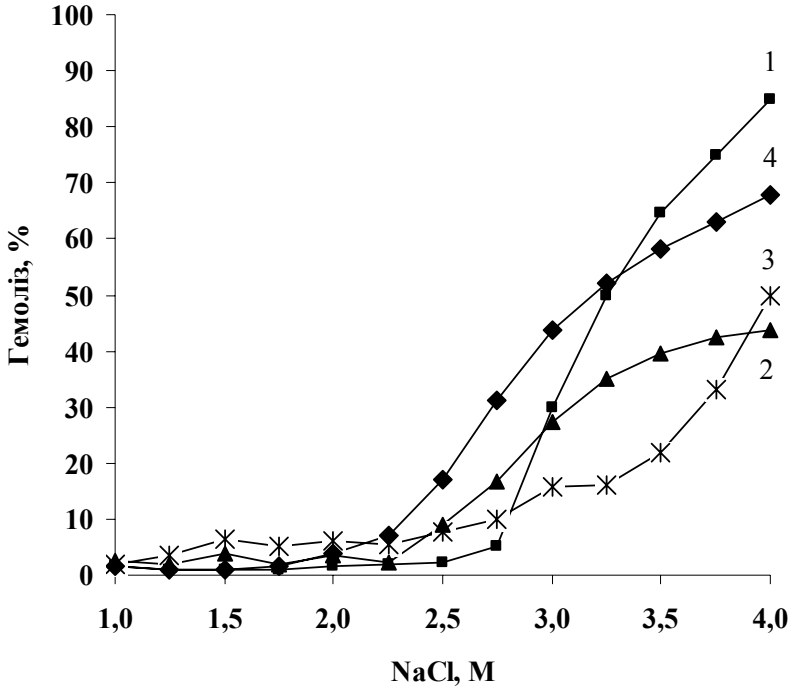


Рис. 3. Залежність рівня гіпертонічного гемолізу еритроцитів ссавців від концентрації NaCl у середовищі при температурі 37 °С: 1 — людина; 2 — кінь; 3 — собака; 4 — бик (n=7)

Еритроцити бика, коня, собаки і людини починають лізувати (гемоліз вище 10 %) у середовищах, які містять NaCl у концентрації 2,50; 2,75, 3,00 і 3,00 М NaCl відповідно. За збільшенням рівня пошкодження у висококонцентрованому сольовому середовищі (4,0 М NaCl) клітини можна розташувати таким чином: собака = кінь < бик < людина, що свідчить про більшу гіпертонічну чутливість еритроцитів бика і людини у порівнянні з еритроцитами собаки і коня.

При температурі інкубаційного середовища 0 °С спостерігається зниження рівня гемолізу еритроцитів досліджуваних ссавців у 4,0 М NaCl у порівнянні з 37 °С (рис. 4), особливо для еритроцитів коня і бика (приблизно у 3–5 разів), для яких мінімальне гіпертонічне пошкодження при 0 °С складає близько 15 %. Таким чином, при гіпертонічному гемолізі еритроцитів (на відміну від гіпотонічного) чинником, що визначає рівень пошкодження клітин у висококонцентрованому сольовому середовищі, є температура.

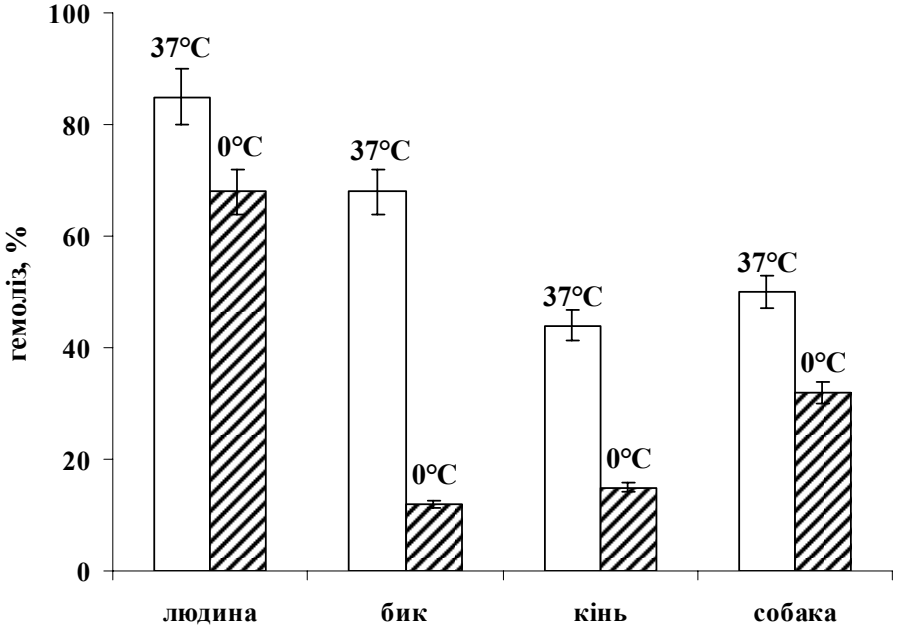


Рис. 4. Гіпертонічний гемоліз еритроцитів ссавців у середовищі, що містить 4,0 М NaCl, при температурі 37 і 0°С (n = 7)

При перенесенні еритроцитів у гіпертонічне середовище відбувається вихід води з клітин, що проявляється у зменшенні об'єму і зміні форми еритроцитів. Вихід із еритроцитів не лише вільної, але і структурнозв'язаної води призводить до порушення конформації білкових молекул, зміни бар'єрних властивостей еритроцитарної мембрани, що супроводжується витоком внутрішньоклітинних катіонів і виходом макромолекул гемоглобіну з еритроцитів. Еритроцити при перенесенні у гіпертонічне середовище деформуються за типом вигину. При цьому утворюються мембранні ділянки із значним розтягуванням (спікули) і значним стискуванням (суттєво увігнуті ділянки мембрани). Саме у цих місцях, де виникає нерівномірна напруга на плазматичній мембрані, внаслідок чого формуються трансмембранні гемолітичні пори [2].

Зародження трансмембранних дефектів і подальше їх збільшення до розміру гемолітичної пори є температурозалежним процесом, формування осмотичної пори визначається в'язко-еластичними властивостями плазматичної мембрани. При 0 °С рівень гіпертонічного гемолізу еритроцитів всіх ссавців нижчий, ніж при 37 °С (рис. 4). Можливо, нерівномірність напруги на мембрані під дією гіпертонії менш виражена, якщо розтягування і стискування мембранного матеріалу обмежені зовнішніми чинниками, зокрема низькою температурою. Гіпертонічна чутливість еритроцитів ссавців при зниженні температури

зменшується неоднаково: коня і бика в 3–5, а людини і собаки — в 1,3–1,5 раза, що, мабуть, обумовлено особливостями фосфоліпідного складу еритроцитарних мембран різних видів ссавців [6, 7].

Різна чутливість еритроцитів ссавців до дії осмотичного чинника (рис. 1–3) може бути обумовлена геометричними особливостями клітин, а саме відношенням площі її поверхні до об'єму S/V [9, 10]. Зіставлення отриманих результатів і розрахованих величин S/V для еритроцитів різних видів ссавців показує, що найбільш чутливими до дії гіпотонічного середовища при температурних режимах 37 і 0 °С є клітини коня і бика (рис. 1–2), які мають невеликі об'ємні характеристики (43 і 50 мкм^3) і значне відношення S/V (1,95 і 1,90). Встановлена залежність спостерігається при лізисі еритроцитів ссавців у середовищі, що містить гіпертонічні концентрації NaCl, які відповідають пороговим значенням (2,7 М NaCl): найбільш стійкими є еритроцити людини з низьким значенням поверхнево-об'ємного співвідношення (1,50).

Крім того, чутливість еритроцитів різних видів ссавців до гіпотонічного (рис. 1) і помірно гіпертонічного середовища (2,7 М NaCl) (рис. 3) корелює з внутрішньоклітинним вмістом води: чим вище чутливість клітин, тим менше внутрішньоклітинної води. Так, чутливі до осмотичного чинника еритроцити бика і коня містять води 1,86 і 1,83, що нижче у порівнянні з аналогічним показником для стійких клітин собаки і людини (1,98 і 2,09 г води/г сухої маси) [5]. Еритроцити людини є більш чутливими до висококонцентрованого сольового середовища (4,0 М NaCl), ніж клітини тварин (рис. 3–4), що, мабуть, обумовлено, насамперед, особливостями складу еритроцитарних мембран. Еритроцити бика і коня, які чутливі до дії гіпотонічного стресу, демонструють високу стійкість до 4,0 М NaCl при 0 °С.

У кріобіологічних дослідженнях явище пошкодження біологічних об'єктів при охолодженні у зоні позитивних температур називають холодовим шоком і розглядують як модель ушкодження клітин при заморожуванні [2]. Багато біологічних об'єктів піддаються холодовому шоку в ізотонічному середовищі, для еритроцитів ссавців, мембрани яких збагачені холестерином, необхідні гіпертонічні умови [2]. В умовах холодового шоку, коли клітини, що знаходяться у гіпертонічному середовищі, охолоджують від 37 до 0 °С, спостерігається різна реакція еритроцитів ссавців на дію стресового чинника (рис. 5).

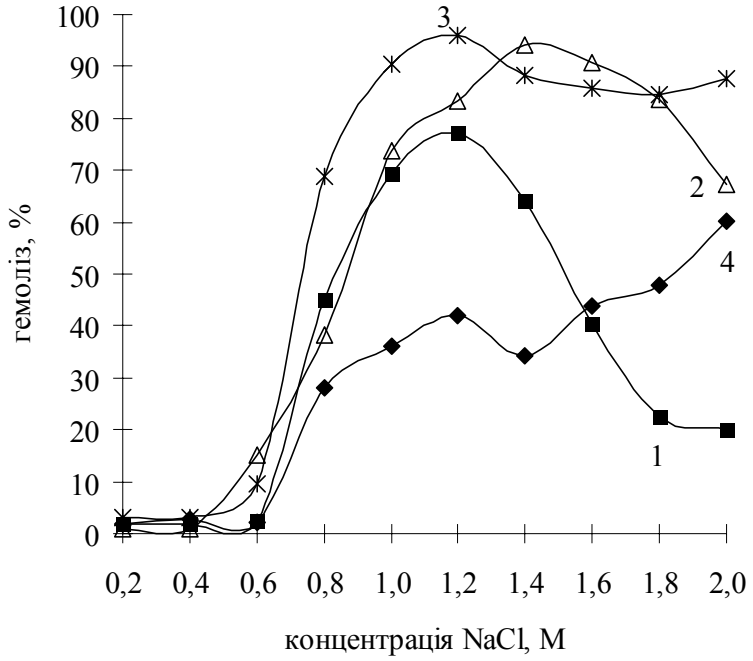


Рис. 5. Залежність рівня гемолізу еритроцитів ссавців від тонічності середовища при охолодженні від 37 до 0 °С: 1 — людина; 2 — кінь; 3 — собака; 4 — бик (n=7)

Для еритроцитів людини, коня і собаки характерне підвищення рівня холодового гемолізу при збільшенні осмолярності середовища і подальшому зменшенні пошкодження, а для клітин бика — монотонне підвищення лізису клітин у всьому досліджуваному концентраційному діапазоні NaCl. Takahashi і Williams [18] при дослідженні холодового шоку еритроцитів людини показали, що зниження температури, від якої охолоджували клітинну суспензію до 0 °C, або зниження осмолярності середовища приводять до зміни характеру тимчасової залежності гемолізу клітин. Отже, відмічена монотонність залежності гемолізу еритроцитів бика від концентрації солі у середовищі і відносно низький рівень ушкодження обумовлені недостатньою для клітин бика силою стресового чинника. Таким чином, можна говорити про стійкість еритроцитів бика до поєднаної дії зміни температури і високої осмолярності середовища.

Виявлена чутливість еритроцитів різних видів ссавців до холодового шоку (рис. 5) обернено пропорційна мембранному вмісту СФМ. Так, найбільш стійкими є еритроцити бика, мембрани яких містять багато СФМ (46 % від загального вмісту ліпідів), а дуже чутливими — клітини коня і собаки, що вміщують 10 і 13 % СФМ відповідно [7]. Крім того, при аналізі вмісту холестерину в еритроцитарних мембранах досліджуваних ссавців встановлено, що цей показник збільшується у наступній послідовності: людина < кінь = собака < бик [7]. Таким чином, еритроцитарні мембрани бика у порівнянні з мембранами інших видів ссавців збагачені холестерином і СФМ. Імовірно, виявлена стійкість еритроцитів бика до дії такого стресового чинника, як холодовой шок (рис. 5), обумовлена здатністю холестерину і СФМ пригнічувати формування дефектів у плазматичній мембрані [19, 20].

Висновки

Еритроцити різних видів ссавців відрізняються за своєю чутливістю до зміни осмотичного та температурного параметрів середовища. Еритроцити коня та бика, які характеризуються високим значенням S/V і низьким вмістом внутрішньоклітинної води, легко пошкоджуються в умовах гіпотонічного стресу, але достатньо стійкі до дії гіпертонічного середовища (4,0 M NaCl, 0 °C). Еритроцити бика, мембрани яких збагачені СФМ і холестерином, стійкі до охолодження від 37 до 0 °C у гіпертонічних середовищах.

N. M. Shpakova

TEMPERATURE AND OSMOTIC SENSITIVITY OF RED BLOOD CELLS OF DIFFERENT MAMMALIAN SPECIES

S u m m a r y

There was performed a comparative study of red blood cells of different mammalian species (human, equine, bovine, canine) to the changes of osmotic and temperature environmental conditions. At 37 ºC a high sensitivity to the action of 4,0 M NaCl is characteristic for human and bovine cells, for human and canine ones at 0 ºC. Human and equine erythrocytes are easily damaged under hypotonic stress conditions at 37 and 0 °C, but they are enough stable to the action of hypertonic medium (4,0 M NaCl, 0 °C). Under cold shock the highest resistance is found for bovine erythrocytes. The findings are discussed with basing on structural and functional peculiarities of erythrocytes of different mammalian species.

Н. М. Шпакова

ТЕМПЕРАТУРНАЯ И ОСМОТИЧЕСКАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ РАЗНЫХ ВИДОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

А н н о т а ц и я

Проведено сравнительное исследование чувствительности эритроцитов разных видов млекопитающих (человек, лошадь, бык, собака) к изменению осмотических и температурных условий среды. При 37 °С высокая чувствительность к действию 4,0 М NaCl характерна для клеток человека и быка, при 0 °С — человека и собаки Эритроциты лошади и быка легко повреждаются в условиях гипотонического стресса при 37 и 0 °С, но достаточно устойчивы к действию гипертонической среды (4,0 М NaCl, 0°С). В условиях холодового шока наибольшая устойчивость отмечена для эритроцитов быка. Полученные результаты обсуждаются с позиции структурно-функциональных особенностей эритроцитов разных видов млекопитающих.

1. Физиология человека / Под ред. В. М. Покровского, Г. Ф. Коротько. — М. : Медицина, 1997. — Т. 2. — 368 с.

2. *Гордиенко Е. А.* Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензій / Е. А. Гордиенко, Н. С. Пушкарь. — К. : Наук. думка, 1994. — 141 с.

3. *Панина Ю. Е.* Физико-математическая теория гипотонического гемолиза эритроцитов человека : автореф. дисс. ...канд. физ-мат.наук / Ю. Е. Панина. — Харьков, 1998. — 20 с.

4. *Гордиенко Е. А.* Основные закономерности явления гипертонического криогемолиза / Е. А. Гордиенко, С. Е. Коваленко // Пробл. криобиологии. — 1997. — № 3. — С. 3−7.

5. *Bogner P.* Steady-state volumes and metabolism-independent osmotic adaptation in mammalian erythrocytes / P. Bogner, K. Sipos, A. Ludány et al // Eur. Biophys. J. — 2002. — V. 31, № 2. — P. 145−152.

6. *Florin-Christensen J.* A unique phospholipids organization in bovine erythrocyte membranes / J. Florin-Christensen, C. E. Suarez, M. Florin-Christensen et al // Proc. Natl. Acad. Sci. — 2001. — V. 98, № 14. — P. 7736−7741.

7. *Wessels J. M.* Some aspects of the osmotic lysis of erythrocytes III. Comparison of glycerol permeability and lipid composition of red blood cell membranes from eight mammalian species / J. M. Wessels, J. H. Veerkamp // Biochim. Biophys. Acta. — 1973. — V. 291, № 1. — P. 190−196.

8. *Guerra-Shinohara E. M.* The erythrocyte cytoskeleton protein 4.2 is not demonstrable in several mammalian species / E. M. Guerra-Shinohara, O. C. Barretto // Braz. J. Med. Biol. Res. — 1999. — V. 32, № 6. — P. 683–687.

9. *Aarts P. A.* Red blood cell size is important for adherence of blood platelets to artery subendothelium / P. A. Aarts, P. A. Bolhuis, K. S. Sakariassen et al // Blood. — 1983. — V. 62, № 1. — P. 214–217.

10. *Jones D. A.* The importance of surface area/volume ratio to the rate of oxygen uptake by red cells / D. A. Jones // J. Gen. Physiol. — 1979. — V. 74, № 5. — P. 643−646.

11. *Benga G.* Diffusional water permeability of mammalian red blood cells / G. Benga, T. Borza // Comp. Biochem. Physiol. — 1995. — V. 112 B, N 4. — P. 653–659.

12. *Tsai S.-T.* High Channel-Mediated Water Permeability in Rabbit Erythrocytes: Characterization in Native Cells and Expression in Xenopus Oocytes / S.-T. Tsai, R. Zhang, A. S. Verkman // Biochemistry. — 1991. — V. 30, N 8. — P. 2087−2092

13. *Oyewale J. O.* Changes in osmotic resistance of erythrocytes of cattle, pigs, rats and rabbits during variation in temperature and pH / J. O. Oyewale // Zentralbl. Veterinarmed. A. — 1992. — V. 39, № 2. — P. 98−104.

14. *Brahm J.* Diffusional water permeability of human erythrocytes and their ghosts / J. Brahm // J. Gen. Physiol. — 1982. — V. 79, № 5. — P. 791−819.

15. *Петренко Ю. М.* Изменение размеров эритроцитов при набухании в гипоосмотических средах / Ю. М. Петренко, Ю. А. Владимиров // Биофизика. — 1987. — Т. 32, № 3. — С. 448−453.

16. *Lieber M. R.* Dymanics of the holes in human erythrocyte membrane ghosts / M. R. Lieber, T. D. Steck // J. Biol. Chem. — 1982. — V. 257, № 19. — P. 11660−11666.

17. *Mela M.* Normal and homogeneous red blood cell populations over a wide range of hyper-iso-hypotonic media. III. Corrected volumes in Coulter Counter measurements / M. Mela, S. Eskelinen // Acta Physiol. Scand. — 1984. — V. 122, № 4. — P. 515−525.

18. *Takahashi T.* Thermal shock hemolysis in human red cells the effects of temperature, time, and osmotic stress / T. Takahashi, R. J. Williams // Cryobiology. — 1983. — V. 20, № 5. — P. 507−520.

19. *Parrinello N.* Sphingomyelin inhibition of Ciona intestinalis (Tunicata) cytotoxic hemocytes assayed against sheep erythrocytes / N. Parrinello, M. Cammarata, L. Lipari, V. Arizza // Dev. Comp.Immunol. — 1995. — V. 19, № 1. — P. 31−41.

20. *Shinozawa S.* Stabilizing effects of cholesterol on changes in membrane permeability and potential induced in red blood cells by lysolecithin / S. Shinozawa, Y. Araki, K. Utsumi, T. Oda // Physiol. Chem. Phys. — 1979. — V. 11, № 2. — P. 161−167.

Рецензент: головний науковий співробітник лабораторії живлення ВРХ, доктор біологічних наук, професор Янович В. Г.