

**К механизму осмотической протекции эритроцитов.****I. Модель осмометра**

UDC 576.324:612.111

S.V. RUDENKO<sup>1</sup>, E.M. SHCHETININA<sup>2</sup>, E.L. VOLOVELSKAYA<sup>1</sup>**On the Mechanism of Osmotic Protection of Erythrocytes.****I. Model of Osmometer**

Исследовали свойства простой модели осмотического баланса в эритроцитах, включающей вклады внутриклеточных электролитов и неидеальные осмотические свойства гемоглобина. На основе анализа этой модели предложены два механизма, которые могут участвовать в повышении устойчивости эритроцитов к гипотоническим средам, индуцированной различными агентами. Один механизм связан с протектирующим сбросом внутриклеточных электролитов, в частности анионов хлора, другой – с изменением внутриклеточной осмолярности, предположительно, за счет деградации тетрамеров гемоглобина в димеры с одновременным перераспределением внутриклеточных электролитов. Показаны пути экспериментальной проверки предложенных механизмов.

**Ключевые слова:** эритроциты, гипотонический гемолиз, осмотическая протекция, осмотическое поведение.

У роботі досліджено властивості простої моделі осмотичного балансу в еритроцитах, яка включає внески внутрішньоклітинних електролітів і неідеальні осмотичні властивості гемоглобіну. На основі аналізу цієї моделі запропоновано два механізми, які можуть бути задіяні у збільшенні стійкості еритроцитів до гіпотонічних середовищ, індукованої різними агентами. Один механізм пов'язаний з протектуючим скиданням внутрішньоклітинних електролітів, зокрема аніонів хлору, другий – зі зміною внутрішньоклітинної осмолярності, можливо, за рахунок деградації тетрамерів гемоглобіну в димери з одночасним перерозподілом внутрішньоклітинних електролітів. Показано шляхи експериментальної перевірки запропонованих механізмів.

**Ключові слова:** еритроцити, гіпотонічний гемолиз, осмотична протекція, осмотична поведінка.

The properties of simple model of osmotic balance in erythrocytes involving the contributions of intracellular electrolytes and non-ideal osmotic properties of hemoglobin were investigated. Analyzing this model we suggested two mechanisms that may take part in the rise of erythrocyte resistance to hypotonic media induced by different agents. One mechanism is associated with protecting release of intracellular electrolytes, in particular, chloride anions, the second one is associated with the change of intracellular osmolarity presumably due to degradation of hemoglobin tetramers into dimers with a simultaneous redistribution of intracellular electrolytes. The ways for experimental testing of the suggested mechanisms have been shown.

**Key words:** erythrocyte, hypotonic hemolysis, osmotic protection, osmotic behavior.

В условиях криоконсервирования эритроциты подвергаются значительным осмотическим нагрузкам, которые ведут к их повреждению и лизису. Механизм, лежащий в основе этого повреждения, имеет коллоидно-осмотическую природу и напоминает гипотонический гемолиз эритроцитов. Известно, что многие амфифильные соединения различной химической природы имеют протектирующее влияние на гипотонический гемолиз, однако механизм этого явления во многом остается неясным [3]. Ранее установили [2], что некоторые офтальмологические препараты, будучи экзогенными агентами, встраиваются в мембрану эритроцитов и изменяют их форму, а также уменьшают степень гипотонического гемолиза клеток [3]. Анализ возможных механизмов показал, что наблюдаемая

During cryopreservation the erythrocytes are exposed to significant osmotic loads which cause their damage and lysis. The mechanism being the basis of this damage is of colloidal osmotic nature and resembles erythrocyte hypotonic hemolysis. It is known that many amphiphilic compounds of various chemical origin have a protective effect in relation to hypotonic hemolysis but the mechanism of this phenomenon has mainly remained unclear [3]. Previously we established [2] that some ophthalmologic preparations being exogenic agents incorporate into erythrocyte membrane and change their shape as well as decreased the rate of hypotonic hemolysis of cells [3]. The analysis of possible mechanisms has shown that an observed protection can not be explained by the increase of cell surface-to-volume ratio and the change of membrane

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

<sup>2</sup>Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

\* 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: rsv@kharkov.ua

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup>V.N.Karazin Kharkov National University, 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: rsv@kharkov.ua

протекция не может быть объяснена увеличением поверхностно-объемного отношения клеток и изменением текучести мембран [3]. Можно предположить, что возникающая устойчивость эритроцитов в гипотонической среде связана с изменением их осмотического баланса. Цель данной работы – на простой модели осмометра и ее реакции на изменение осмотического давления внешней среды установить роль осмотического баланса в механизме осмотической протекции эритроцитов амфифильными соединениями, которую они проявляют в отношении осмотического гемолиза.

### 1. Модель осмометра

В средах с пониженной осмолярностью эритроциты набухают, а с повышенной – сжимаются, т. е. ведут себя подобно осмометрам [11, 13]. Это их свойство определено необходимостью поддерживать осмотический баланс, который предполагает, что в любой среде осмотическое давление цитозоля равно осмотическому давлению внешней среды. Это равенство используется во всех моделях, описывающих осмотическое поведение эритроцитов [5, 9, 14], которые включают такие факторы, как электронейтральность и равенство химических потенциалов проникающих через мембрану компонентов в условиях равновесия [9, 14]. В настоящей работе мы рассматриваем простейшую модель эритроцита как везикулы, содержащего гемоглобин и KCl, находящегося в среде с NaCl и непроникающим компонентом, например сахарозой, что соответствует обычным экспериментальным условиям.

Внутриклеточное осмотическое давление такой везикулы можно представить в виде:

$$C = \frac{n_K}{V_w} + \frac{n_{Cl}}{V_w} + \varphi \cdot \frac{n_{Hb}}{V}, \quad (1)$$

где  $n_K$ ,  $n_{Cl}$ ,  $n_{Hb}$  – количество ионов калия, хлора и гемоглобина, мМ;  $\varphi$  – осмотический коэффициент гемоглобина;  $V_w$  – объем воды в клетке;  $V$  – суммарный объем клетки, л.

В изотонических условиях при осмотическом давлении внешней среды, равной 300 мОсм, имеем:

$$C_0 = C_{K0} + C_{Cl0} + \varphi_0 \cdot C_{Hb0}, \quad (2)$$

где индекс 0 соответствует значениям параметров в условиях изотонии, которые рассматривают как исходное состояние везикулы;  $C_K$  и  $C_{Cl}$  – концентрация ионов калия и хлора во внутриклеточной воде, мМ;  $C_{Hb}$  – концентрация гемоглобина, мМ, отнесенная ко всему объему клетки.

fluidity [3]. One may suggest that an appearing resistance of erythrocytes in hypotonic medium is associated with the change of their osmotic balance. The aim of this work was to determine the role of an osmotic balance in erythrocyte osmotic protection mechanism caused by amphiphilic compounds, which they manifest in relation to osmotic hemolysis, using a simple model of osmometer and its response to the change of osmotic pressure of extracellular environment.

### 1. Model of osmometer

Erythrocytes swell in the media with a decreased osmolarity and they shrink in the media with increased one, *i. e.* they behave as osmometers [11, 13]. This property is based on the necessity to maintain an osmotic balance which suggests that in any medium the osmotic pressure of cytosol is equal to osmotic pressure of an environment. This equation is used in all the models describing osmotic behavior of erythrocytes [5, 9, 14] which include such factors as electrical neutrality and equation of chemical potentials penetrating the membrane of components in equilibration conditions [9, 14]. In this work we consider the simplest model of erythrocyte as vesicle containing hemoglobin and KCl being in the medium with NaCl and non-penetrating component, for example with sucrose, corresponding to routine experimental conditions.

Intracellular osmotic pressure of this vesicle can be represented as:

$$C = \frac{n_K}{V_w} + \frac{n_{Cl}}{V_w} + \varphi \cdot \frac{n_{Hb}}{V}, \quad (1)$$

where  $n_K$ ,  $n_{Cl}$ ,  $n_{Hb}$  are the amount of potassium, chlorine and hemoglobin ions, mM;  $\varphi$  is an osmotic coefficient of hemoglobin;  $V_w$  is volume of water in a cell;  $V$  is total volume of cell, l.

In isotonic conditions at environmental osmotic pressure of 300 mOsm we have:

$$C_0 = C_{K0} + C_{Cl0} + \varphi_0 \cdot C_{Hb0}, \quad (2)$$

where the subscript 0 conforms to the indices of parameters in isotonia considered as initial vesicle state;  $C_K$  and  $C_{Cl}$  are concentrations of potassium and chlorine in intracellular water, mM;  $C_{Hb}$  is concentration of hemoglobin, mM, related to the whole cell volume.

At given initial concentration of hemoglobin the equation (2) determines an initial value of potassium and chlorine ions' concentration corresponding to initial equilibration conditions.

Considering cell volume as  $V = V_{Hb} + V_w$  we introduce the definition of a relative volume as  $V_{rel} = V/V_0$  and initial fraction of hemoglobin in a cell as the parameter  $A = V_{Hb}/V_0$ . Combining the equations (1) and

При заданной исходной концентрации гемоглобина уравнение (2) определяет исходное значение концентраций ионов калия и хлора, которое соответствует начальным условиям равновесия.

Учитывая, что объем клетки  $V = V_{Hb} + V_w$ , введем определение относительного объема как  $V_{rel} = V/V_0$ , а исходной фракции гемоглобина в клетке – как параметр  $A = V_{Hb}/V_0$ . Комбинируя уравнения (1) и (2), получаем окончательное выражение для внутриклеточной осмолярности в зависимости от относительного объема клетки:

$$C = \frac{1-A}{V_{rel}} \cdot C_{K+Cl0} + \varphi \cdot \frac{C_{Hb0}}{V_{rel}}, \quad (3)$$

где  $C_{K+Cl0}$  – начальная суммарная концентрация ионов калия и хлора в клетке.

Ранее было получено выражение для осмотического коэффициента гемоглобина [9]:

$$\varphi = 1 + 0,0645 \cdot C_{Hb} + 0,0258 \cdot C_{Hb}^2.$$

Концентрацию гемоглобина определяли по отношению к объему внутриклеточной воды, а не ко всему объему клетки. Поскольку мы рассчитываем концентрацию гемоглобина по отношению к клеточному объему (уравнение (1)), то скорректированное выражение для осмотического коэффициента имеет вид:

$$\varphi = 1,3947 + 0,1255 \cdot C_{Hb} + 0,07 \cdot C_{Hb}^2,$$

где  $C_{Hb}$  – концентрация гемоглобина, мМ, на литр клеток.

Если концентрация гемоглобина и соответственно параметр  $A$  равны нулю, то уравнение (3) трансформируется в классическое выражение для идеального осмометра  $V_{rel} = C_0/C$ , где  $C_0$  – стандартная изотоническая осмолярность;  $C$  – текущая осмолярность внеклеточной среды. Для такого осмометра увеличение или уменьшение внешней осмолярности в два раза приводит к двухкратному уменьшению или увеличению клеточного объема. Объект, описываемый уравнением (3), будем называть модельным осмометром (МОс).

## 2. Поведение модельного осмометра в зависимости от концентрации гемоглобина

Установлено, что осмотическое поведение МОс в координатах  $C_0/C$  от  $V_{rel}$  зависит от концентрации гемоглобина, если она существенно превышает стандартную концентрацию для эритроцитов, равную 5 мМ. Для концентрации 5 мМ поведение МОс

(2) we obtain a final expression for intracellular osmolarity depending on relative cell volume:

$$C = \frac{1-A}{V_{rel}} \cdot C_{K+Cl0} + \varphi \cdot \frac{C_{Hb0}}{V_{rel}}, \quad (3)$$

where  $C_{K+Cl0}$  is initial total concentration of potassium and chlorine ions in the cell.

Previously the equation for hemoglobin osmotic coefficient was obtained [9]:

$$\varphi = 1 + 0.0645 \cdot C_{Hb} + 0.0258 \cdot C_{Hb}^2.$$

Hemoglobin concentration was estimated as the ratio to the volume of intracellular water rather than the whole volume of a cell. As we calculate a hemoglobin concentration in respect of cell volume (equation (1)), the corrected equation for osmotic coefficient is:

$$\varphi = 1.3947 + 0.1255 \cdot C_{Hb} + 0.07 \cdot C_{Hb}^2,$$

where  $C_{Hb}$  is hemoglobin concentration, mM, per liter of cells.

If hemoglobin concentration and correspondingly the parameter  $A$  are zero, the equation (3) transforms to a classic equation for an ideal osmometer  $V_{rel} = C_0/C$  where  $C_0$  is standard isotonic osmolarity;  $C$  is current osmolarity of extracellular medium. For this osmometer a two-fold increase or decrease of external osmolarity induces two-fold decrease or increase of a cell volume. The object described by equation (3) will be called as a model osmometer (MO).

## 2. Behavior of model osmometer depending on hemoglobin concentration

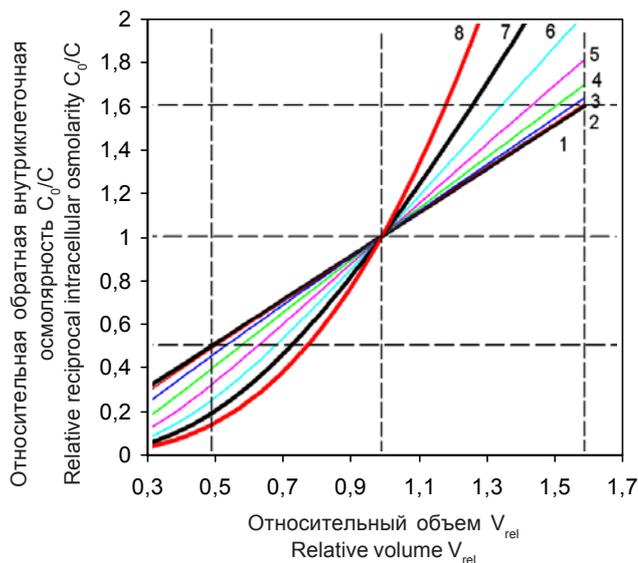
We have established that osmotic behavior of MO in coordinates  $C_0/C$  vs.  $V_{rel}$  depends on hemoglobin concentration if it significantly exceeds a standard concentration for erythrocytes which is 5 mM. For 5 mM concentration the behavior of MO almost does not differ from its behavior at zero concentration of hemoglobin, particularly in hypotonic region ( $V_{rel} > 1$ ). For evaluation of MO osmotic behavior and its differences during varying the model parameters it is reasonable to choose two reference points. The one corresponds to a double osmolarity (600 mOsm) at which an ideal MO has  $V_{rel} = 0.5$ , the second, in the case of  $V_{rel} = 1.6$ , i. e. critical hemolytic volume of erythrocyte [13, 14], is 187.5 mOsm and is considered to be critical hemolytic osmolarity, when MO hemolysis occurs. This value is close to experimentally calculated osmolarity causing 50% hemolysis of erythrocytes, 174 mOsm [3], and other experimental data [4].

практически не отличается от его поведения при нулевой концентрации гемоглобина, особенно в гипотонической области ( $V_{rel} > 1$ ). Для оценки осмотического поведения МОс и его отличий при варьировании модельных параметров целесообразно выбрать две референтные точки. Одна соответствует двойной осмолярности (600 мОсм), при которой идеальный МОс  $V_{rel} = 0,5$ , другая – при  $V_{rel} = 1,6$ , т. е. критическому гемолитическому объему эритроцита [13, 14], имеет значение 187,5 мОсм и ее можно считать критической гемолитической осмолярностью, при которой происходит гемолиз МОс. Это значение близко к экспериментально оцененной величине осмолярности, вызывающей 50%-й гемолиз эритроцитов 174 мОсм [3], и другим экспериментальным данным [4].

Приведенные данные свидетельствуют, что увеличение концентрации гемоглобина делает МОс осмотически устойчивым; в гипотонической среде он набухает тем меньше, чем больше в нем концентрация гемоглобина. Например, МОс с концентрацией гемоглобина 11 мМ не достигает критического гемолитического объема 1,6 в гипотонической среде 150 мОсм. Таким образом, теоретически возможно увеличение осмотической стойкости эритроцитов за счет регулирования внутриклеточной концентрации гемоглобина.

Данные, приведенные на рис. 1, были получены исходя из предположения, что внутри МОс содержится гемоглобин, растворенный во внутриклеточной воде. При этом не предполагалось, что молекулы гемоглобина могут занимать определенный объем внутри клетки как твердые вещества, что принимается во внимание в других моделях [5, 9, 14]. Данные на рис. 2 иллюстрируют, как учет объема гемоглобина ( $V_{Hb}$ ) влияет на осмотическое поведение МОс при концентрации гемоглобина 5 и 9,68 мМ.

В обоих случаях увеличение параметра  $A$  ведет к увеличению угла наклона кривых, значит МОс становится менее чувствительным к изменению тоничности. Кроме этого, при концентрации гемоглобина 5 мМ зависимости имеют линейный характер во всем диапазоне, а при 9,68 мМ – в гипотонической области. Можно отметить, что при некоторых значениях параметров зависимости имеют одинаковый наклон. Установлено, что существует множество комбинаций параметров  $C_{Hb}$  и  $A$ , при которых эти зависимости фактически совпадают с широким диапазоном значений относительного объема. Это означает, что такие МОс являются одинаковыми в своем осмотическом поведении, т. е. в реакции их объема в ответ на изменение осмолярности среды.



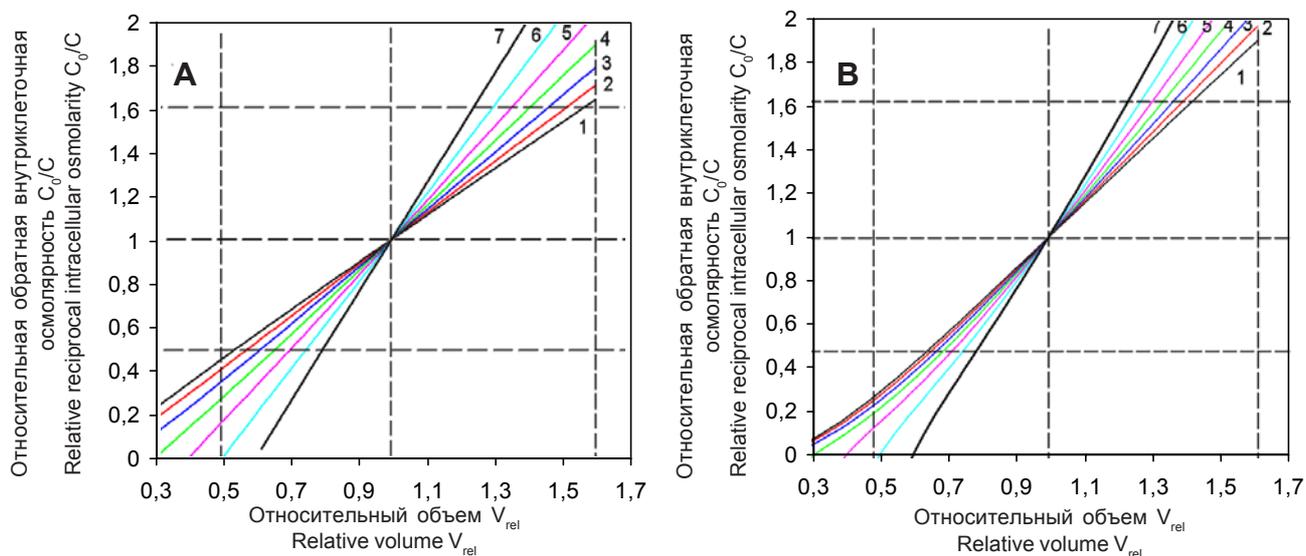
**Рис. 1.** Зависимость относительной обратной внутриклеточной осмолярности от относительного объема МОс при  $A = 0$  и различных исходных концентрациях гемоглобина, мМ: 1 – 0; 2 – 3; 3 – 5; 4 – 7; 5 – 9; 6 – 11; 7 – 13; 8 – 15,27.

**Fig. 1.** Dependence of relative reciprocal intracellular osmolarity on MO relative volume at  $A=0$  and different initial hemoglobin concentrations, mM: 1 – 0; 2 – 3; 3 – 5; 4 – 7; 5 – 9; 6 – 11; 7 – 13; 8 – 15.27.

Represented data attest to the fact that the increase of hemoglobin concentration makes MO osmotically resistant; in hypotonic medium the less it swells the more hemoglobin concentration is. For example, MO with 11 mM hemoglobin concentration does not reach a critical hemolytic volume of 1.6 in 150 mOsm hypotonic medium. So an increase of erythrocyte osmotic resistance due to regulation of intracellular hemoglobin concentration is theoretically possible.

Data in Fig. 1 were obtained suggesting that hemoglobin being inside MO is dissolved in intracellular water. It was not considered that hemoglobin molecules could occupy a certain volume in a cell as solid substances, that is taken in account in other models [5, 9, 14]. The data in Fig. 2. show how taking into account the hemoglobin volume ( $V_{Hb}$ ) affect an osmotic behavior of MO at hemoglobin concentration of 5 and 9.68 mМ.

In both cases an increase of the parameter  $A$  leads to increase of curves' slope so MO becomes less sensitive to a tonicity change. Moreover, at hemoglobin concentration of 5 mМ the dependences are of linear character in the whole range, and at 9.68 mМ they are linear only in hypotonic region. We may note that at some values of parameters the dependences have the same slope. It has been established that there are many combinations of parameters  $C_{Hb}$  and  $A$ , at which these dependences almost coincide with a wide range



**Рис. 2.** Зависимость относительной обратной внутриклеточной осмолярности от относительного объема МОс при разном объеме гемоглобина (параметр  $A$ : 1 – 0; 2 – 0,1; 3 – 0,2; 4 – 0,3; 5 – 0,4; 6 – 0,5; 7 – 0,6) и при концентрации гемоглобина 5 мМ (А) и 9,68 мМ (В).

**Fig. 2.** Dependence of relative reversible intracellular osmolarity on relative volume of MO at different hemoglobin volume (parameter  $A$ : 1 – 0; 2 – 0.1; 3 – 0.2; 4 – 0.3; 5 – 0.4; 6 – 0.5; 7 – 0.6) and hemoglobin concentration of 5 (A) and 9.68 mM (B).

### 3. Поведение модельного осмометра в зависимости от концентрации внутриклеточных электролитов

Для дальнейшего изучения мы выбрали два близких МОс: один с концентрацией гемоглобина 5 мМ и  $A = 0,3$ , что соответствует параметрам нормального эритроцита в изотонических условиях (обозначен C5A03) [9, 14], другой – с концентрацией гемоглобина 9,68 мМ и  $A = 0$  (обозначен C9,68A0). На рис. 3 показано осмотическое поведение этих МОс при изменении в них концентрации внутриклеточного калия. Во втором случае МОс C9,68A0 моделируется как идеальный раствор белка без учета того, что сами молекулы белка занимают некий физический пространственный объем в растворе. Видно, что при одной и той же концентрации ионов калия C5A03 имеет значительно меньший объем, чем C9,68A0. Это объясняется тем, что при высоких концентрациях гемоглобина его нелинейный вклад во внутриклеточную осмолярность сильнее, чем при малых. Таким образом, хотя между этими МОс отсутствует разница в их ответе на изменение внешней осмолярности в условиях, когда МОс не теряют электролиты, их поведение существенно отличается в условиях утечки электролитов.

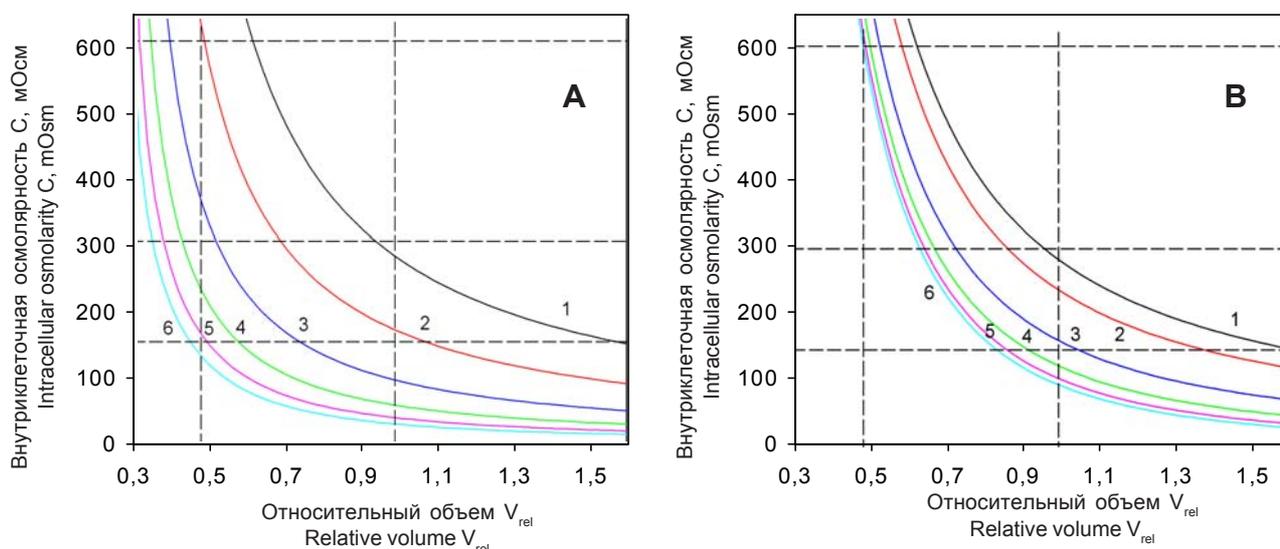
Исходя из приведенных выше свойств МОс, можно предложить два возможных механизма осмотической протекции эритроцитов в гипотонической среде. Один из них включает “протектирующий” сброс внутриклеточных электролитов, другой – повышение концентрации внутриклеточного

of relative volume indices occur. This means that these MOs are identical in their osmotic behavior, *i. e.* in their volume response to the change of medium osmolarity.

### 3. Behavior of model osmometer depending on concentration of intracellular electrolytes

For further investigation we chose two close MOs: one had 5 mM hemoglobin concentration and  $A = 0.3$  that corresponded to the parameters of normal erythrocyte in isotonic conditions (denoted as C5A03) [9, 14], another one had 9.68 mM hemoglobin concentration and  $A = 0$  (denoted as C9.68A0). Fig. 3 shows an osmotic behavior of these MOs following the change of intracellular potassium concentration inside them. In the second case MO C9.68A0 is modelled as an ideal solution of protein without considering the fact that protein molecules occupy a certain physical spatial volume in the solution. It is seen that at the same concentration of potassium ions C5A03 has significantly less volume than C9.68A0. It is due to non-linear contribution of hemoglobin into the intracellular osmolarity which is stronger at high concentrations than at low ones. Thus, although there is no difference between these MOs in their response for a change of external osmolarity, in the case if they do not loose electrolytes, their behavior significantly differs during leakage of electrolytes.

On the basis of previously mentioned MO properties we can suggest two possible mechanisms of erythrocyte osmotic protection in hypotonic medium. One of them includes ‘protecting’ release of intracellular electrolytes, another one involves a rise of intracellular



**Рис. 3.** Зависимость внутриклеточной осмолярности от относительного объема МОс C5A03 (А) и C9.68A0 (В) при разных значениях внутриклеточной концентрации ионов калия и хлора, мМ: 1 – 260 (А); 195 (В); 2 – 150; 3 – 75; 4 – 37,5; 5 – 18,75; 6 – 9,375.

**Fig. 3.** Dependence of intracellular osmolarity vs. relative volume of MO C5A03 (A) and C9.68A0 (B) at different indices of intracellular concentration of potassium and chlorine ions, mM: 1 – 260 (A); (B) 1 – 195; 2 – 150; 3 – 75; 4 – 37.5; 5 – 18.75; 6 – 9.375.

гемоглобина, что может быть обусловлено переходом тетрамеров гемоглобина (HbT) в димеры (HbD), в результате чего количество осмотически активных частиц в цитоплазме увеличивается в два раза и приводит к росту осмотического давления.

Следует отметить, что второй механизм для своей реализации в гипотонических условиях также требует частичного сброса внутриклеточных электролитов, чтобы скомпенсировать возросшее осмотическое давление цитоплазмы, поэтому он может рассматриваться как комплексный механизм, включающий оба элемента.

Ранее мы установили [3], что в гипотонической среде с осмолярностью 150 мОсм β-блокаторы проявляют значительный протектирующий эффект. Хотя объем эритроцитов в тех условиях не измерялся, можно предположить, что он не превышал критического гемолитического объема 1,6, который достигался при отсутствии блокаторов. Согласно вариантам предлагаемой модели это связано либо с уменьшением внутриклеточной концентрации электролитов, либо с сопутствующим переходом HbT→HbD. Кривые 1 на рис. 3 описывают эту зависимость для C5A03 и C9,68A0. Чтобы объем МОс не превышал 1,6 при осмолярности 150 мОсм, C5A03 должен уменьшить концентрацию электролитов от 281 до 260 мМ, а C9,68A0 – от 211 до 195 мМ. Согласно нашей модели, чтобы установить, какой именно механизм действительно реализовался, проведение дополнительных осмотических воздействий не эффек-

hemoglobin concentration that may be stipulated by transformation of hemoglobin tetramers (HbT) into dimers (HbD) thereby the number of osmotically active particles in cytoplasm doubles and induces rise of osmotic pressure.

It should be noted that the second mechanism for its implementation in hypotonic conditions also requires a partial release of intracellular electrolytes to compensate an increased osmotic pressure of cytoplasm so it can be considered as the complex mechanism including both elements.

We established previously [3] that in hypotonic medium with 150 mOsm osmolarity the β-blockers provide a significant protecting effect. Although the volume of erythrocytes in those conditions was not measured, we may suppose it did not exceed critical hemolytic volume of 1.6 which they reached when blockers were absent. According to the suggested model it is associated either with decrease of electrolyte intracellular concentration or with accompanying transformation HbT→HbD. The curves 1 in Fig. 3 describe this dependence for C5A03 and C9.68A0. In order that the MO volume will not exceed 1.6 at 150 mOsm osmolarity, C5A03 has to decrease electrolyte concentration from 281 down to 260 mM and C9.68A0 – from 211 down to 195 mM. According to our model it is not useful to perform additional osmotic exposures to establish which mechanism was actually implemented, since curves 1 (Fig. 3) for both MOs are too close and MOs had the same volumes at any other osmolarities, *i. e.* they reveal identity feature as it was previously mentioned. However, whereas beha-

тивно, поскольку кривые 1 (рис. 3) для двух МОс очень близки и они имеют одинаковые объемы при любых иных осмолярностях, т. е. проявляют свойство идентичности, как уже отмечалось выше. Однако поскольку поведение этих МОс существенно отличается при их истощении по электролитам, одним из возможных путей проверки модели может быть индуцирование повышенной калиевой проводимости за счет активации канала Гардоша [15] или обработки клеток валиномицином [10]. В этом случае можно ожидать, что если основой протекции является сброс электролитов, то такой МОс (C5A03) будет сжиматься значительно сильнее, чем при протекции с участием перехода HbT→HbD. Протектирующий эффект различных соединений не всегда коррелирует с увеличением калиевой проницаемости [6, 8, 12]. Например, протектирующий эффект лизолецитина, наоборот, сопровождался уменьшением проницаемости мембран для калия в гипотонических условиях [7]. Установлено, что для повышения устойчивости эритроцитов в гипотонических условиях клетки должны предварительно потерять значительное количество калия [1, 4]. Это, вероятно, свидетельствует о том, что протектирующий эффект в большей степени связан с перераспределением анионов хлора, а не катионов. Наши оценки изменения количества анионов, которые необходимы для протекции, вполне соответствуют внутриклеточному содержанию этих анионов (~80–100 мМ), которые могут быстро обмениваться на ионы OH с участием анионного обменника AE1 [16, 17] и тем самым понижать внутриклеточную осмолярность. Предложенный в данной работе механизм осмотической протекции отличается от модели, согласно которой различные амфипаты влияют на процесс развития гемолитической поры [3]. Последняя модель не предполагает изменений осмотического баланса и, следовательно, осмотическое поведение протектированных эритроцитов не должно отличаться от контрольных. Экспериментальная проверка предложенной модели будет представлена в следующих работах.

## Выводы

На основе анализа модели осмометра предложено два механизма осмотической протекции эритроцитов в гипотонических средах. Один из них связан с протектирующим сбросом внутриклеточных электролитов, другой – с изменением внутриклеточной осмолярности, предположительно, за счет деградации тетрамеров гемоглобина в димеры с одновременным перераспределением внутриклеточных электролитов. Показаны пути экспериментальной проверки предложенной модели.

avior of these MOs significantly differs during their depletion by electrolytes, induction of a elevated potassium conductivity due to activation of Gardos channel [15] or cell treatment with valinomycin [10], may be one of the possible ways for model evaluation. In this case we can expect that if electrolytes release is the basis of protection, such MO (C5A03) will shrunk much more than in the case of transformation HbT→HbD. Protecting effect of different compounds not always correlates with an increase of potassium permeability [6, 8, 12]. For example, protecting effect of lysolecithin, *vice versa* was accompanied with a decrease of membrane permeability for potassium in hypotonic conditions [7]. It was established that to elevate the erythrocyte resistance in hypotonic conditions the cells have to loose preliminary a significant amount of potassium [1, 4]. This probably attests the fact that a protecting effect is a greater extent associated with redistribution of chlorine anions rather than cations. Estimated by us changes of anion amount, essential for protection, entirely correspond to intracellular content of these anions (~80–100 mM) that may rapidly exchange for OH ions with anion exchanger AE1 [16, 17] and in such a way decrease intracellular osmolarity. Proposed here mechanism of osmotic protection differs from the model according to which different amphipaths affect the process of hemolytic pore development [3]. The latter does not suggest the changes of an osmotic balance and therefore osmotic behavior of protected erythrocytes has not to differ from the control ones. Experimental testing of the suggested model will be demonstrated in the further papers.

## Conclusions

On the basis of osmometer model analysis we suggested two mechanisms of erythrocyte osmotic protection in hypotonic media. The first one is associated with ‘protecting’ release of intracellular electrolytes; another one is related to the change of intracellular osmolarity presumably due to degradation of hemoglobin tetramers into dimers with simultaneous redistribution of intracellular electrolytes. The ways for experimental testing of suggested model were shown.

## References

1. Nipot Ye. Ye. Temperature and some lytic peptides influence on human erythrocytes during dehydration-rehydration: Author's abstract of the thesis of Candidate of Biological Sciences.– Kharkov, 1997.– 24 p.
2. Rudenko S.V., Said M.K., Bondarenko V.A. Determination of coefficients of distribution of anti-glaucoma drugs between erythrocytes and medium // Biophysical Bulletin.– 2009.– Vol. 2, N23.– P. 69–76.
3. Rudenko S.V., Said M.K., Volovelskaya Ye.L. Influence of some  $\beta$ -blockers on erythrocyte hypotonic hemolysis // Problems of Cryobiology.– 2010.– Vol. 20, N1.– P. 7–17.

## Литература

1. *Нипот Е.Е.* Влияние температуры и некоторых литических пептидов на эритроциты человека при дегидратации-регидратации: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1997.– 24 с.
2. *Руденко С.В., Сауд М.К., Бондаренко В.А.* Определение коэффициентов распределения антиглаукомных препаратов между эритроцитами и средой // *Біофізичний вісник.*–2009.– Т. 2, №23.– С. 69–76.
3. *Руденко С.В., Сауд М.К., Воловельская Е.Л.* Влияние некоторых бета блокаторов на гипотонический гемолиз эритроцитов // *Проблемы криобиологии.*– 2010.– Т. 20, №1.– С. 7–17.
4. *Bennekou P., Barksman T.L., Christophersen P., Kristensen B.I.* The human red cell voltage-dependent cation channel. Part III: Distribution homogeneity and pH dependence // *Blood Cells Mol. Dis.*– 2006.–Vol.36, N1.– P. 10–14.
5. *Bisognano J.D., Dix J.A., Pratap P.R. et al.* Proton (or hydroxide) fluxes and the biphasic osmotic response of human red blood cells // *J. Gen. Physiol.*– 1993.– Vol. 102, N1.– P. 99–123.
6. *Eskelinen S., Mela M.* Cation permeability and mechanical properties of the erythrocyte membrane under the influence of lysophosphatidylcholine (LPC) in isotonic and hypotonic media // *Acta Physiol Scand.*– 1984.– Vol. 122, N4.– P. 527–534.
7. *Eskelinen S.* Effect of lysophosphatidylcholine on salt permeability through the erythrocyte membrane under haemolytic conditions // *Gen. Physiol Biophys.*– 1986.– Vol. 5, N6.– P. 637–647.
8. *Fogt A., Hagerstrand H., Isomaa B.* Effects of N,N'-bisdimethyl-1,2-ethanediamine dichloride, a double-chain surfactant, on membrane-related functions in human erythrocytes // *Chem. Biol. Interact.*–1995.–Vol.94, №2.–P. 147–155.
9. *Freedman J.C., Hoffman J.F.* Ionic and osmotic equilibria of human red blood cells treated with nystatin // *J. Gen. Physiol.*– 1979.–Vol. 74, N2.– P. 157–185.
10. *Freedman J.C., Novak T.S.* Electrodiffusion, barrier, and gating analysis of DIDS-insensitive chloride conductance in human red blood cells treated with valinomycin or gramicidin // *J. Gen. Physiol.*– 1997.– Vol. 109, N2.– P. 201–216.
11. *Heubusch P., Jung C.Y., Green F.A.* The osmotic response of human erythrocytes and the membrane cytoskeleton // *J. Cell Physiol.*– 1985.– Vol. 122, N2.– P. 266–272.
12. *Isomaa B., Hagerstrand H., Paatero G., Engblom A.C.* Permeability alterations and antihaemolysis induced by amphiphiles in human erythrocytes // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1986.–Vol. 860, N3.– P. 510–524.
13. *Jay A.W., Rowlands S.* The stages of osmotic haemolysis // *J. Physiol* –1975.– Vol. 252, N3.– P. 817–832.
14. *Lew V.L., Bookchin R.M.* Volume, pH, and ion-content regulation in human red cells: analysis of transient behavior with an integrated model // *J. Membr. Biol.*– 1986.– Vol. 92, N1.– P. 57–74.
15. *Rudenko S.V., Peresetskaia N.M.* Anomalous transport of cations upon stimulation of a Ca-dependent K-channel in rehydrated erythrocytes // *Biokhimiia.*– 1995.– Vol. 60, N7.– P. 1146–1154.
16. *Sato Y., Yamakose H., Suzuki Y.* Mechanism of hypotonic hemolysis of human erythrocytes // *Biol. Pharm. Bull.*–1993.– Vol.16, N5.– P. 506–512.
17. *Sato Y., Yamakose H., Suzuki Y.* Participation of band 3 protein in hypotonic hemolysis of human erythrocytes // *Biol. Pharm. Bull.*– 1993.– Vol.16, N2.– P. 188–194.

Accepted 19.07.2011

Поступила 19.07.2011  
Рецензент О.И. Гордиенко