

УДК 577.352.052: 576.311.342.2: 57.043

Д.И. Александрова, Н.Г. Землянских\*

## Влияние ионного состава криопротекторной среды и криоконсервирования на чувствительность эритроцитов человека к механическому стрессу

UDC 577.352.052: 576.311.342.2: 57.043

D.I. Aleksandrova, N.G. Zemlianskykh\*

## Impact of Ionic Composition of Cryoprotective Medium and Cryopreservation on Human Erythrocyte Sensitivity to Mechanical Stress

**Реферат:** Исследовано влияние электролитов и ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на развитие гемолитических повреждений эритроцитов человека при механическом стрессе в растворах криопротекторов, а также эффект замораживания-отогрева клеток в присутствии глицерола и полиэтиленгликоля (ПЭГ) на их механическую устойчивость. Установлено, что при росте концентрации солей во внеклеточной среде механическая стабильность клеток снижается. Вместе с тем отсутствие электролитов в растворах криопротекторов также снижает их устойчивость при механическом стрессе. Добавление  $\text{Ca}^{2+}$  в среды повышает гемолиз клеток только в присутствии ПЭГ, но не глицерола, очевидно, вследствие разного влияния данных веществ на активность  $\text{Ca}^{2+}$ -регулирующих систем. Введение соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) в состав сред снижает устойчивость эритроцитов в присутствии обоих криопротекторов, что может быть связано с влиянием хелатора на мембраносвязанный  $\text{Ca}^{2+}$ . Криоконсервирование эритроцитов повышает их чувствительность к механическому стрессу, и даже удаление криопротекторов не позволяет восстановить свойства клеток до контрольных параметров.

**Ключевые слова:** эритроцит, мембрана, механическая устойчивость,  $\text{Ca}^{2+}$ , ионная сила, криоконсервирование.

**Реферат:** Досліджено вплив електролітів та іонів  $\text{Ca}^{2+}$  на розвиток гемолітичних ушкоджень еритроцитів людини при механічному стресі в розчинах криопротекторів, а також ефект заморожування-відігріву клітин у присутності глицеролу і поліетиленгліколю (ПЕГ) на їх механічну стійкість. Встановлено, що при зростанні концентрації солей у позаклітинному середовищі механічна стабільність клітин знижується. Разом з тим відсутність електролітів у розчинах криопротекторів також знижує їх стійкість при механічному стресі. Додавання  $\text{Ca}^{2+}$  в середовища підвищує гемоліз клітин тільки в присутності ПЕГ, але не глицеролу, очевидно, внаслідок різного впливу даних речовин на активність  $\text{Ca}^{2+}$ -регулюючих систем. Введення солі етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА) до складу середовищ знижує механічну стійкість еритроцитів у присутності обох криопротекторів, що може бути пов'язано з його впливом на мембранозв'язаний  $\text{Ca}^{2+}$ . Криоконсервування еритроцитів підвищує їх чутливість до механічного стресу і навіть видалення криопротекторів не дозволяє відновити властивості клітин до контрольних параметрів.

**Ключові слова:** еритроцит, мембрана, механічна стійкість,  $\text{Ca}^{2+}$ , іонна сила, криоконсервування.

**Abstract:** In this research, we have studied the impact of electrolytes and  $\text{Ca}^{2+}$  ions on the development of hemolytic damages in human erythrocytes in cryoprotectant solutions under mechanical stress, as well as the effect of freeze-thawing of cells in the presence of glycerol and polyethylene glycol (PEG) on their mechanical stability. The decrease in mechanical stability of cells was found when the salt concentration in extracellular medium increased. At the same time, the absence of electrolytes in cryoprotectant solutions reduced their stability under mechanical stress as well. The  $\text{Ca}^{2+}$  introduction into the media increased the cell hemolysis only in the presence of PEG, but not glycerol, apparently due to different effects of these substances on the activity of  $\text{Ca}^{2+}$ -regulating systems. The introduction of salt of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) into the media composition reduced the erythrocyte membrane mechanical stability in the presence of the both cryoprotectants, which might be due to the chelator effect on membrane-bound  $\text{Ca}^{2+}$ . Cryopreservation of erythrocytes increased their sensitivity to mechanical stress, and even the cryoprotectant removal could not restore the cell properties up to the control parameters.

**Key words:** erythrocyte, membrane, mechanical stability,  $\text{Ca}^{2+}$ , ionic strength, cryopreservation.

Сдвиги концентрации солей в процессе кристаллизации и оттаивания воды [24, 27] или осмолярности среды при добавлении/удалении гипертонических растворов криопротекторных агентов (КПА) сопровождаются изменениями объема клеток, а мембраны испытывают механические на-

Shifts in salt concentration during water crystallization and thawing [17, 20] or the alterations in medium osmolarity when introducing/removing the hypertonic solutions of cryoprotective agents (CPAs) are accompanied by changes in cell volume, while the membranes pass through mechanical

Відділ кріоцитології, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Department of Cryocytology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;  
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52  
електронна пошта: nzemliansky@gmail.com

\*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952  
e-mail: nzemliansky@gmail.com

Надійшла 20.03.2018

Прийнята до друку 14.11. 2019

Received March, 20, 2018

Accepted November, 14, 2019

© 2019 N.G. Zemlianskykh, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

пряжения, подвергаясь деформациям сжатия и растяжения. Кроме того, существенное влияние на мембраны в процессе криоконсервирования оказывает механический стресс, вызванный давлением кристаллов льда или взаимодействием клеток между собой и со стенками контейнера в процессе солидификации [9, 17, 34, 37]. Противостоять разрушающим эффектам механического стресса при криоконсервировании клеткам помогают КПА, которые влияют не только на характер кристаллизации жидкости, но и на структурно-функциональные свойства плазматических мембран [15, 33].

Эффективность защитного действия КПА зависит от типа клеток и в значительной степени определяется особенностями модификации структурно-функционального состояния отдельных клеточных компонентов и изменениями внешних параметров клетки [5]. При замораживании-отогреве эритроцитов человека глицерол и полиэтиленгликоль с м. м. 1500 (ПЭГ), относящиеся соответственно к эндо- и экзоцеллюлярному типам КПА, обеспечивают высокую сохранность клеток. Кроме того, в ряду других исследованных соединений (маннитол, сахароза, декстран) данные вещества также продемонстрировали высокую эффективность в защите клеток при механическом стрессе [2]. Анализ взаимосвязи между изменениями свойств растворов (вязкость, осмотическое давление) и степенью повреждения клеток в исследованных условиях позволил заключить, что защитный эффект КПА не связан непосредственно со свойствами растворов, а определяется модификацией характеристик плазматической мембраны [2]. Можно допустить, что глицерол и ПЭГ повышают механическую устойчивость эритроцитов в стрессовых условиях путем влияния на структурно-функциональное состояние компонентов мембрано-цитоскелетного комплекса, поскольку ключевая роль в ответе клеток на механические воздействия принадлежит плазматической мембране [39] и белкам цитоскелета, соединенного с ней [26, 35]. Вместе с тем действие КПА может зависеть от физико-химических параметров среды, сопутствующих процессам замораживания-отогрева.

Действие солей на мембрано-цитоскелетный комплекс обусловлено, по крайней мере, двумя причинами: влиянием ионной силы на структуру отдельных компонентов и повышением осмотического давления, индуцирующего потоки воды через мембрану. Превышение критических значений гидростатического давления приводит к образованию пор в мембране и лизису клеток [28]. Поскольку КПА реализуют свое защитное действие

stresses, in particular the compression-stretch deformations. In addition, the mechanical stress, caused by ice crystal pressure or cell interaction with one another and with the container walls during solidification, significantly affects the membranes during cryopreservation [1, 10, 27, 31]. The CPAs help to resist the damaging effects of mechanical stress during cell cryopreservation [7, 26] by affecting not only the nature of liquid crystallization, but the structural and functional properties of plasma membranes as well.

The efficiency of a protective action of CPAs depends on cell type and is largely determined by the features of modification of structure and function of individual cell components and changes in external parameters of a cell [40]. During human erythrocyte freeze-thawing, the glycerol and polyethylene glycol with 1500 MW (PEG), corresponding to endo- and exocellular types of CPAs, respectively, ensure a high preservation of cells. In addition, among the other studied compounds (mannitol, sucrose, dextran), these substances demonstrated a high efficiency in cell protection under mechanical stress [35]. The analysis of relationship between the changes in properties of solutions (viscosity, osmotic pressure) and a degree of cell damage under the studied conditions allowed concluding that a protective effect of CPAs was not directly associated with the properties of solutions, but determined by modification of plasma membrane characteristics [35]. The glycerol and PEG may be assumed to increase the erythrocyte membrane mechanical stability under stress conditions via affecting the structural and functional state of membrane-cytoskeleton complex components, since the plasma membrane [33] and bound with it cytoskeletal proteins play a key role in cell response to mechanical effects [19, 29]. At the same time, the CPAs effect may depend on the medium physical and chemical parameters, accompanying the freeze-thawing.

The effect of salts on membrane-cytoskeleton complex is stipulated by at least two reasons, *i. e.* the impact of ionic strength on structure of individual components and an increase in osmotic pressure, inducing water flows through the membrane. The exceeding of critical values of hydrostatic pressure entails the pore formation in membrane and cell lysis [21]. Since CPAs implement their protective effect at high concentrations, a decrease in osmotic pressure by salt elimination from the medium may be assumed to increase a cell survival. However, the way in which a mechanical stability of membranes under stress conditions will alter in the electrolyte-free cryoprotective media, has still remained unclear.



при высоких концентрациях, можно допустить, что при снижении осмотического давления путем элиминации солей из среды выживаемость клеток будет повышаться. Однако остается непонятным, как при отсутствии электролитных компонентов в криопротекторных средах изменится механическая устойчивость мембран в стрессовых условиях.

Вместе с тем устойчивость мембрано-цитоскелетного комплекса к стрессу в присутствии криопротекторов может модифицироваться при участии ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , выполняющего роль вторичного мессенджера. Ранее установленные факты изменения функциональной активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азы [4, 6, 7] и повышения уровня внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  [18, 19] под влиянием КПА указывают на возможность включения ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в регуляцию структурного состояния и функциональной активности компонентов мембраны. Учитывая, что ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , присутствующие во внеклеточной среде, являются основным источником повышения концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$ ) в эритроцитах человека, их хелатирование путем введения соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) в криопротекторные среды может повлиять на изменение уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке и, следовательно, на устойчивость эритроцитов в стрессовых условиях.

В процессе замораживания-отогрева, несмотря на присутствие КПА, часть клеток все же подвергается летальным или сублетальным повреждениям. Это связано, во-первых, с гетерогенностью клеточных суспензий, т. е. наличием клеток с разным исходным уровнем жизнеспособности, и, во-вторых, с тепловым градиентом, обусловленным разной удаленностью клеток от источников холода или тепла, т.е. неоднородностью изменений физико-химических параметров среды при значительных сдвигах температуры ( $37^{\circ}\text{C} \rightarrow -196^{\circ}\text{C} \rightarrow 37^{\circ}\text{C}$ ). Поэтому механические свойства мембран криоконсервированных эритроцитов могут отличаться от свойств нативных клеток. В связи с этим важно понимать, насколько полноценными являются криоконсервированные клетки, поскольку в физиологических условиях при прохождении через узкие капилляры эритроциты подвергаются сдвиговому стрессу [40]. Следовательно, оценка механической устойчивости криоконсервированных эритроцитов важна для прогноза безопасности и эффективности их применения в клинике.

Цель работы заключалась в изучении влияния ионного состава растворов КПА на развитие гемолитических повреждений эритроцитов человека при механическом стрессе. При этом оценку

At the same time, the stability of membrane-cytoskeletal complex to stress in the presence of cryoprotectants may be modified with involvement of  $\text{Ca}^{2+}$  ions, acting as secondary messenger. The previously revealed facts of a change in functional activity of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase [37–39] and an increase in the level of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  [11, 12] under CPA effect indicate the opportunity of inclusion of  $\text{Ca}^{2+}$  ions into regulation of a structural state and functional activity of membrane components. If considering the  $\text{Ca}^{2+}$  ions, presented in extracellular medium, as the main source of an increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$ ) in human erythrocytes, their chelation via introducing the salt of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) into cryoprotective media may affect the change in  $\text{Ca}^{2+}$  level in cell and consequently, the erythrocyte stability under stress conditions.

During freeze-thawing, despite the CPAs presence, some cells still undergo lethal or sublethal damages. This is firstly associated with the heterogeneity of cell suspensions, *i. e.* the presence of cells with different initial levels of viability, and, secondly, with a thermal gradient, stipulated by different distance of cells from cold or heat sources, *i. e.* heterogeneity of changes in physical and chemical parameters of medium at significant temperature shifts ( $37^{\circ}\text{C} \rightarrow -196^{\circ}\text{C} \rightarrow 37^{\circ}\text{C}$ ). Therefore, the mechanical properties of cryopreserved erythrocyte membranes may differ from those of native cells. In this regard, it is important to understand how integral the cryopreserved cells are, since under physiological conditions the erythrocytes undergo a shift stress when passing through narrow capillaries [34]. Therefore, the assessment of mechanical stability of cryopreserved erythrocytes is important for forecasting the safety and efficiency of their use in clinic.

The research aim was to study the impact of ionic composition of CPAs solutions on development of hemolytic damages in human erythrocytes under mechanical stress. In this case, the mechanical stability of cells was assessed in the presence of physiological concentrations of NaCl and  $\text{Ca}^{2+}$  and when removing them from cryoprotective media. In addition, the effect of cell freeze-thawing under glycerol and polyethylene glycol protection on their mechanical stability was studied.

### Materials and methods

Here, we used the following reagents: Tris, sucrose (Sigma, USA); PEG (MW 1500), dextran (MW 40,000), glucose,  $\text{CaCl}_2$  (Fluka, USA); mannitol, glycerol, EDTA (Serva, Germany); NaCl, KCl,  $\text{MgCl}_2$  and HCl (manufactured in Russia and Ukraine (chemically pure or extra pure grades)).



механической устойчивости клеток проводили в присутствии физиологических концентраций NaCl и Ca<sup>2+</sup> и при их удалении из криопротекторных сред. Кроме того, исследовали влияние замораживания-отогрева клеток под защитой глицерола и полиэтиленгликоля на их механическую устойчивость.

### Материалы и методы

В работе использовали следующие реактивы: Tris, сахароза («Sigma», США); ПЭГ м. м. 1500, декстран м. м. 40 000, глюкоза, CaCl<sub>2</sub> («Fluka», США); маннитол, глицерол, ЭДТА («Serva», Германия); NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub> и HCl (производства России и Украины (х.ч. или ос.ч.)).

Объектом исследования служили эритроциты крови доноров, заготовленной с использованием глюкозо-цитратного раствора (Центр службы крови, г. Харьков). Эритроциты осаждали центрифугированием при 1200g в течение 10 мин при комнатной температуре, удаляли плазму и лейкоцитарные компоненты крови. Затем к осадку добавляли раствор 150 mM NaCl, 10 mM Трис-HCl (pH 7,4) в объеме, 5–7-кратно превышающем объем клеточной массы, и отмывали от остатков плазмы и белых клеток 3-кратным центрифугированием в аналогичном режиме.

Устойчивость эритроцитов к механическому стрессу оценивали по уровню гемолиза в соответствии с ранее описанными методами [2, 8]. Отмытые эритроциты (1 мл) соединяли с растворами криопротекторных веществ (5 мл) в пластиковых стаканчиках (конечный гематокрит примерно 15%). Растворы маннитола, глицерола, сахарозы, ПЭГ и декстрана в 15%-х концентрациях были приготовлены на основе раствора 150 mM NaCl, 10 mM Трис-HCl (pH 7,4) или дистиллированной воды в зависимости от условий эксперимента. В стаканчики осторожно вносили 50 штук пластиковых шариков (диаметр 5 мм, масса 1,5 г) и магнитную палочку. Суспензию эритроцитов с шариками перемешивали в течение часа на магнитной мешалке ММ-5 (Украина) при скорости 1200 об/мин. Для определения гемолитических повреждений аликвоты клеток центрифугировали при 1200g и отбирали супернатант. Гемолиз определяли на спектрофотометре СФ-4А («Ломо», Россия) с проточной кюветой при длине волны 543 нм по количеству вышедшего из клеток гемоглобина. Количество гемоглобина выражали в процентах по отношению к 100%-му гемолизу эритроцитов в присутствии 0,1% детергента тритона X-100.

Влияние ионов Ca<sup>2+</sup> на развитие гемолитических повреждений эритроцитов при механическом стрессе исследовали в 15%-х растворах ПЭГ

The research objects were the donor blood erythrocytes, prepared with glucose-citrate solution (Center for Blood Service, Kharkiv). The erythrocytes were pelleted by centrifugation at 1200g for 10 min at room temperature and the plasma and leukocyte blood components were removed. The pelleted cells were supplemented with a solution of 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) in a volume 5–7 times exceeding that of cell mass, and washed out of plasma and white cell residues by a 3-fold centrifugation using the similar regimen.

The erythrocyte stability to mechanical stress was assessed by hemolysis level as described previously [28, 35]. The washed erythrocytes (1 ml) were combined with the solutions of cryoprotective substances (5 ml) in plastic cups (final hematocrit approximately 15%). Mannitol, glycerol, sucrose, PEG and dextran 15% solutions were prepared on the basis of the solution, consisting of 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) or distilled water, depending on the experimental conditions. Fifty pieces of plastic balls (5 mm diameter, 1.5 g weight) and a magnetic stick were carefully introduced into the cups. The erythrocyte suspension with balls was stirred for 1 hr with MM-5 magnetic stirrer (Ukraine) at a rate of 1200 rpm. To determine the hemolytic lesions, the cell aliquots were centrifuged at 1200g and the supernatant was taken. The hemolysis was determined with SF-4A spectrophotometer (Lomo, Russia) with a flow cell at 543 nm wavelength by the amount of hemoglobin released from cells. The amount of hemoglobin was expressed as a percentage with reference to 100% erythrocyte hemolysis in the presence of 0.1% detergent Triton X-100.

The impact of Ca<sup>2+</sup> ions on the development of hemolytic damage in erythrocytes under mechanical stress was studied in 15% solutions of PEG and glycerol, containing 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) with an alternative supplement of CaCl<sub>2</sub> (1 mM) or EDTA (2 mM).

To assess the changes in mechanical stability under cryopreservation effect, the erythrocytes washed out of plasma and white blood cells were treated with the glycerol- and PEG-based cryoprotective solutions and frozen in a liquid nitrogen (–196°C). The erythrocytes were supplemented with the first solution (30% glycerol, 4% mannitol, 120 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)) in an equal volume with a constant stirring at room temperature. The second solution (30% PEG, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)) was introduced in an equal volume into cooled erythrocytes at ~5°C. Then the erythrocytes were transferred into the containers for freezing and immersed into liquid nitrogen (–196°C). The thawing was done in a water bath at 42–44°C.



и глицерола, содержащих 150 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4) с альтернативным добавлением  $\text{CaCl}_2$  (1 мМ) или ЭДТА (2 мМ).

Для оценки изменений механической стабильности под влиянием криоконсервирования эритроциты, отмытые от плазмы и белых клеток крови, обрабатывали криозащитными растворами на основе глицерола и ПЭГ и замораживали в жидком азоте ( $-196^\circ\text{C}$ ). Первый раствор (30% глицерола, 4% маннитола, 120 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4)) добавляли в равном объеме к эритроцитам при постоянном перемешивании при комнатной температуре. Второй раствор (30% ПЭГ, 150 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4)) добавляли в равном объеме к охлажденным эритроцитам при температуре  $\sim 5^\circ\text{C}$ . Затем эритроциты переносили в контейнеры для замораживания и погружали в жидкий азот ( $-196^\circ\text{C}$ ). Отогрев проводили в водяной бане при  $42\text{--}44^\circ\text{C}$ .

После размораживания эритроциты отмывали от криопротекторов. Для глицерол-содержащих образцов процедура отмывки включала осаждение клеток центрифугированием (1200g, 5–7 мин) и три этапа отмывки с использованием следующих растворов: 600 мМ NaCl (первая отмывка) и 150 мМ NaCl (вторая и третья отмывки). Для образцов, криоконсервированных с ПЭГ, процедура отмывки включала осаждение клеток центрифугированием (800g, 5–7 мин) с последующим разведением осажденных клеток равным объемом раствора 150 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4), при аналогичном режиме центрифугирования.

Статистическую обработку результатов выполняли с использованием программного пакета «Statgraphics plus 2.1» («Manugistic Inc.; STATistical GRAPHICs system», США). Данные представлены в виде  $M \pm SE$  (среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка). Статистическую значимость различий между экспериментальными группами оценивали с помощью множественного рангового теста Фишера по процедуре группировки выборок с наименьшей значимой разницей. В каждой серии экспериментов проведено 6 опытов.

### Результаты и обсуждение

В ходе замораживания клеточных суспензий повышается концентрация солей во внеклеточной среде, вследствие чего могут изменяться механические свойства плазматических мембран. Действие высоких концентраций электролитов на механическую устойчивость эритроцитов в процессе криоконсервирования можно изучить в модельных экспериментах при механическом стрессе. Установлено, что превышение физиологического диапазона NaCl увеличивало чувстви-

After freeze-thawing, the erythrocytes were washed from cryoprotectants. For glycerol-containing samples, the washing procedure included the cell pelleting by centrifugation (1200g, 5–7 min) and three washing steps using the following solutions: 600 мМ NaCl (first washing) and 150 мМ NaCl (second and third washing). For the samples, cryopreserved with PEG, the washing procedure included the cell pelleting by centrifugation (800g, 5–7 min), followed by dilution of pelleted cells with an equal volume of solution of 150 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl (pH 7.4) using the similar centrifugation mode.

The findings were statistically processed using the Statgraphics plus 2.1 for Windows software (Manugistics Inc.; STATistical GRAPHICs system, USA). The data were presented as  $M \pm SE$  (mean  $\pm$  standard error). The statistical significance of differences between experimental groups was evaluated using the Fisher's least significant difference test. There were performed 6 experiments in each series.

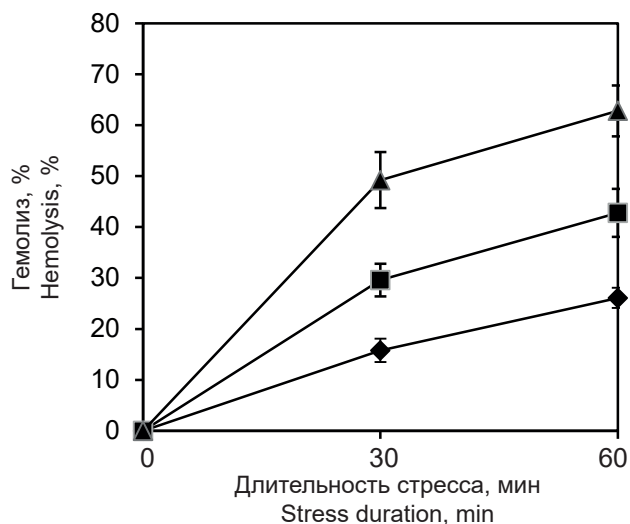
### Results and discussion

When freezing the cell suspensions, the concentration of salts in extracellular medium increases, therefore the mechanical properties of plasma membranes may change. The effect of high electrolyte concentrations on erythrocyte membrane mechanical stability during cryopreservation can be studied in model experiments with mechanical stress. The exceeding of NaCl physiological range was found to increase the membrane sensitivity to stress, and the hemolytic damages of erythrocytes augmented with increasing salt concentration and stress exposure duration (Fig. 1). If assuming that a decrease in cell stability under these conditions was caused not only by osmotic effects, but an increase in ionic strength values as well, one could expect a decrease in electrolyte content in hypertonic solutions of CPAs to positively affect the mechanical stability of membranes. At this research stage, taking into account the complexity of experiments, we comparatively assessed the membrane mechanical stability during osmotic shrinkage of cells in the presence of pure CPAs solutions and the ones, supplemented with NaCl of physiological level. The cell hemolysis in the media free of electrolytes was determined as significantly higher than in similar solutions, supplemented with electrolyte components (Fig. 2). Meanwhile, the NaCl removal from PEG solution had a minimal effect on erythrocyte membrane mechanical stability as compared with the other studied CPAs. Obviously, the cell membrane stability under mechanical stress is largely determined by ion redistribution between intra- and extracellular media, stipulated by the CPAs effect on various ion-



тельность мембран к стрессу, а гемолитические повреждения эритроцитов нарастают с увеличением концентрации соли и продолжительности стрессового воздействия (рис. 1). Допустив, что снижение устойчивости клеток в данных условиях вызвано не только осмотическими эффектами, но и увеличением значений ионной силы, можно ожидать, что уменьшение содержания электролитов в гипертонических растворах КПА положительно повлияет на механическую устойчивость мембран. Учитывая трудоемкость экспериментов, на данном этапе работы была дана сравнительная оценка механической стабильности мембран при осмотическом сжатии клеток в присутствии чистых растворов КПА и растворов, дополненных физиологическим уровнем NaCl. Установлено, что гемолиз клеток в средах, не содержащих электролитов, был существенно выше, чем в аналогичных растворах, дополненных электролитными компонентами (рис. 2). При этом удаление NaCl из раствора ПЭГ оказывало минимальный эффект на механическую устойчивость эритроцитов в сравнении с другими исследованными КПА. Очевидно, стабильность мембраны клеток при механическом стрессе в значительной мере определяется перераспределением ионов между внутри- и внеклеточной средой, обусловленным влиянием КПА на различные ион-транспортирующие системы. Замораживание эритроцитов в растворах экзоцеллюлярных соединений (полиэтиленоксид и сахароза) с низким содержанием NaCl также повышало уровень гемолиза после отогрева относительно показателей, полученных при использовании растворов, дополненных NaCl до физиологического уровня [1]. Полученный эффект может быть связан с изменением механических свойств мембраны, о чем свидетельствуют результаты наших экспериментов. Кроме того, было отмечено, что при относительно высоком содержании NaCl (48–150 мМ) лучший криозащитный эффект обеспечивала сахароза, а при низком содержании соли (0–48 мМ) – полиэтиленоксид [1]. Представленные факты являются основанием для проведения дальнейших исследований, направленных на определение критического уровня концентрации NaCl в растворах КПА для изменений механической устойчивости клеток. Полученные экспериментальные данные могут быть полезны при разработке криоконсервантов на основе экзоцеллюлярных веществ.

Анализируя причины снижения механической устойчивости клеток при повышении концентрации NaCl во внеклеточной среде, важно указать на ее одновременное увеличение внутри клеток вследствие их осмотического сжатия и перерас-



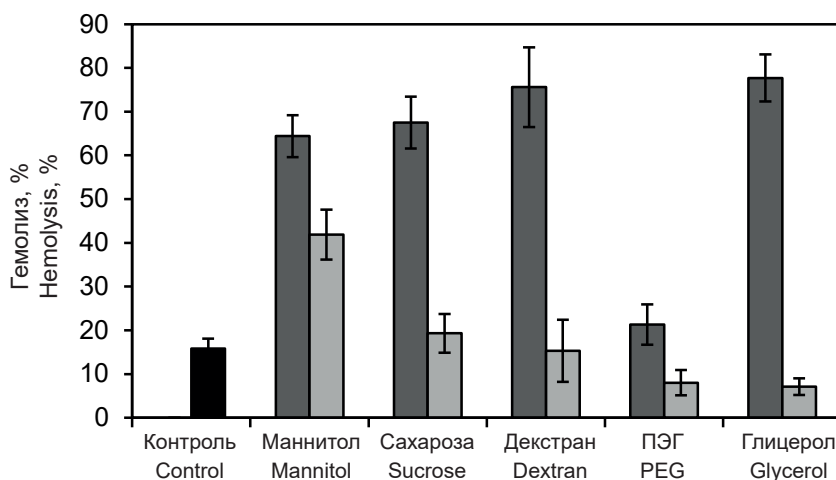
**Рис. 1.** Гемолитические повреждения эритроцитов при механическом стрессе в растворах NaCl: (♦ – 150 мМ (контроль), ■ – 400 мМ, ▲ – 600 мМ).

**Fig. 1.** Hemolytic damages in erythrocytes during mechanical stress in NaCl solutions: (♦ – 150 mM (control), ■ – 400 mM, ▲ – 600 mM).

transporting systems. The erythrocyte freezing in solutions of exocellular compounds (polyethylene oxide and sucrose) with a low NaCl content also increased the hemolysis level after thawing as compared with the indices obtained when using the solutions supplemented with NaCl up to physiological level [8]. The resulted effect may be associated with a change in mechanical properties of the membrane, as evidenced by our findings. In addition, it was noted that under a relatively high NaCl content (48–150 мМ), a higher cryoprotective effect was provided by sucrose, but under low salt content (0–48 мМ) it was done by polyethylene oxide [8]. The reported facts are the reason for further studies aimed at determining the critical level of NaCl concentration in CPAs solutions to change the cell mechanical stability. These findings may be useful in designing the exocellular substance-based cryopreservatives.

When analyzing the reasons for a decrease in mechanical stability of cells with an increase in NaCl concentration in extracellular medium, it is important to indicate its simultaneous increase inside the cells due to their osmotic shrinkage and ion redistribution. Therefore, a negative effect may be realized via modifying the characteristics of both outer and inner layers of membrane, and cytoskeletal proteins as well. Disorders of structural state or interactions between the components of membrane-cytoskeleton complex may be associated with screening of surface charges of macromolecules. The impact of high ionic strength on protein modifi-





**Рис. 2.** Гемолитические повреждения эритроцитов в 15%-х растворах КПА при механическом стрессе в течение 30 мин: ■ – водные растворы; □ – растворы с включением 150 мМ NaCl, 10 мМ Трис-НСl (рН 7,4). Различия между водными и электролит-содержащими растворами КПА статистически значимы,  $p < 0,01$ .

**Fig. 2.** Hemolytic damages of erythrocytes in 15% CPAs solutions under mechanical stress within 30 min: ■ – aqueous solutions; □ – solutions supplemented with 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4). Differences between aqueous and electrolyte-containing CPAs solutions are statistically significant,  $p < 0.01$ .

пределения ионов. Поэтому негативный эффект может быть реализован через модификацию характеристик как наружного, так и внутреннего слоев мембраны, а также белков цитоскелета. Нарушения структурного состояния или взаимодействий между компонентами мембрано-цитоскелетного комплекса могут быть связаны с экранированием поверхностных зарядов макромолекул. Влияние высокой ионной силы на модификацию белков подтверждается уменьшением содержания анкирина, белков полос 3 и 4.2 в препаратах изолированных мембранных скелетов эритроцитов, полученных с использованием тритона X-100, по мере увеличения ионной силы экстрагирующего раствора (5–600 мМ NaCl) [29]. Этот факт указывает на изменение сродства между белками, опосредующими связь цитоскелета с трансмембранными компонентами в данных условиях. Кроме того, повышение концентрации соли может изменять связи между компонентами мембрано-цитоскелетного комплекса через липидные рафты, обогащенные специфическими маркерными белками, значительная часть которых прикреплена к цитоскелетной сети эритроцитов посредством электростатических взаимодействий, которые нарушаются при увеличении ионной силы и/или pH [12, 13]. Такие трансформации делают мембрану более чувствительной к стрессовым воздействиям и способствуют дестабилизации эритроцитов в гипертонических растворах NaCl при механическом стрессе.

cation is confirmed by a decreased content of ankyrin, band 3 and protein 4.2 in the samples of isolated erythrocyte membrane skeletons, obtained by means of Triton X-100, with increasing an ionic strength of extracting solution (5–600 mM NaCl) [22]. This fact indicates a change in the affinity between the proteins, mediating the connection of cytoskeleton with transmembrane components under these conditions. In addition, an increase in salt concentration may change the contacts between the membrane-cytoskeleton complex components through the lipid rafts, enriched with specific marker proteins, a significant part of which is attached to cytoskeletal network of erythrocytes through electrostatic interactions, which are disordered with an increase in ionic strength and/or pH [4, 5].

These transformations make the membrane more sensitive to stressful effects and contribute to erythrocyte destabilization in hypertonic NaCl solutions under mechanical stress.

The change in erythrocyte membrane mechanical stability with an increase in NaCl concentration in extracellular medium may be also stipulated by peculiarities of selective effect of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  ions on lipid-ion interactions in membrane. It is known that at the same concentration of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$ , the  $\text{Na}^+$  ions are more strongly adsorbed on polar heads of lipids, and a significant excess of  $\text{K}^+$  concentration is necessary to overcome the  $\text{Na}^+$  redundancy on membrane [32]. This is of especial importance for intracellular membrane surface, where the negatively charged lipids predominate. Therefore, if a relative content of  $\text{Na}^+$  in cytoplasm augments, a redistribution of cations associated with lipid head groups becomes possible, affecting the electrostatic potential of inner surface of membrane and disordering the balance of structural characteristics of its outer and inner layers [32].

A negative effect of electrolyte absence in cryoprotective media on erythrocyte membrane mechanical stability is obviously associated with the dynamics of changes in membrane potential. It is known that when transferring cells into an isotonic medium with low ionic strength (sucrose-contained), a transmembrane potential sharply increases from  $-10$  to  $+73$  mV [18] as a result of high membrane permeability for  $\text{Cl}^-$  ions, being 100 times



Изменение механической устойчивости мембран эритроцитов при повышении концентрации NaCl во внеклеточной среде также может быть обусловлено особенностями селективного влияния ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  на липид-ионные взаимодействия в мембране. Известно, что при одинаковой концентрации  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  ионы  $\text{Na}^+$  сильнее адсорбируются на полярных головках липидов, и для преодоления избыточности  $\text{Na}^+$  на мембране необходимо значительное превышение концентрации  $\text{K}^+$  [38]. Это особенно важно для внутриклеточной поверхности мембраны, на которой преобладают отрицательно заряженные липиды. Поэтому в случае увеличения относительного содержания  $\text{Na}^+$  в цитоплазме возможно перераспределение катионов, связанных с липидными головными группами, которое влияет на электростатический потенциал внутренней поверхности мембраны и нарушает баланс структурных характеристик ее наружного и внутреннего слоев [38].

Негативное влияние исключения электролитов из криопротекторных сред на механическую устойчивость эритроцитов, очевидно, связано с динамикой изменений мембранного потенциала. Известно, что при переносе клеток в изотоническую среду с низкой ионной силой (содержащей сахарозу) трансмембранный потенциал резко увеличивается с  $-10$  до  $+73$  мВ [25] в результате высокой проницаемости мембраны для ионов  $\text{Cl}^-$ , в 100 раз превышающей ее проницаемость для  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ . Однако в течение 30–60 мин значение потенциала снижается до равновесного состояния [25] благодаря активации  $\text{K}^+(\text{Na}^+)/\text{H}^+$ -обменника и неселективного потенциал-зависимого катионного канала [11]. Кроме того, в данных условиях происходит также увеличение значения внутриклеточного pH до 7,7 с последующим более медленным подкислением цитоплазмы до 7,2 в течение 30 мин [20]. Очевидно, что возникновение диффузного потенциала  $\text{Cl}^-$  при исключении  $\text{Na}^+$  из внеклеточной среды, последующее перераспределение катионов и изменение значений внутриклеточного pH могут происходить и в гипертонических растворах КПА, что приводит к дестабилизации структурных компонентов мембраны.

Еще одним механизмом дестабилизации мембран в условиях стресса при снижении ионной силы среды является изменение плотности упаковки липидных молекул [22]. При отсутствии электролитов в среде усиливается электростатическое отталкивание полярных головных групп фосфолипидов, что увеличивает расстояние между ними и снижает способность образовывать водородные связи. Вследствие чего плотность

higher than its permeability for  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$ . However, within 30–60 min, the potential value decreases down to the equilibrium state [18] due to the activation of  $\text{K}^+(\text{Na}^+)/\text{H}^+$ -exchanger and non-selective potential-dependent cation channels [3]. In addition, under these conditions, the value of intracellular pH also increases up to 7.7, followed by a slower acidification of cytoplasm to 7.2 within 30 min [13]. Obviously, the appearance of diffusion potential of  $\text{Cl}^-$  when excluding  $\text{Na}^+$  from extracellular medium, and a subsequent cation redistribution and a change in values of intracellular pH may occur in hypertonic solutions of CPAs as well, resulting in destabilization of structural components of membrane.

A change in packing density of lipid molecules is other mechanism of membrane destabilization under stress when an ionic strength of the medium decreases [15]. When there are no electrolytes in the medium, an electrostatic repulsion of polar head groups of phospholipids is enhanced, increasing thereby the distance between them and reducing their capability to form hydrogen bonds. As a result, the packing density of tail residues also decreases, by reducing the favorable van der Waals interactions between the tail parts of lipid molecules.

The erythrocyte stability under mechanical stress with a change in  $\text{Ca}^{2+}$  level within cryoprotective media was assessed in glycerol and PEG as the examples. Taking into account the fact, that the source for an increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$  may be the trace amounts of ions in saline solutions, achieving the concentration of  $10^{-6}$ – $10^{-5}$  M [24], and a random entry of  $\text{Ca}^{2+}$  through the channel-like paths in erythrocyte membranes [2], the assumption arises whether the  $\text{Ca}^{2+}$  removal from cryoprotective solutions by chelating of divalent cations with EDTA will lead to changes in erythrocyte membrane mechanical stability and affect the cell survival during cryopreservation. At the same time, an increase in  $\text{Ca}^{2+}$  concentration (1 mM) in cryoprotective media up to the level of physiological values may promote elucidating the role of  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated processes in maintaining the erythrocyte membrane mechanical stability under stress conditions. As experiments showed, the introduction of  $\text{Ca}^{2+}$  or EDTA into PEG-containing media caused an almost twofold increase in erythrocyte hemolysis under mechanical stress as compared with cell damage in unmodified solution (Fig. 3). The EDTA caused a similar reaction in a glycerol-containing medium, but  $\text{Ca}^{2+}$  caused no significantly effect on cell resistance (Fig. 3). Thus, when including EDTA into glycerol- and PEG-containing media, the erythrocyte membrane mechanical stability decreases regardless of





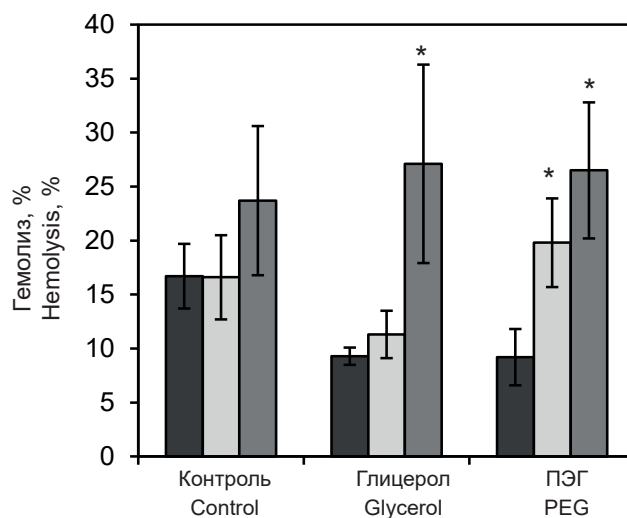
упаковки хвостовых остатков также снижается, уменьшая благоприятные ван-дер-ваальсовы взаимодействия между хвостовыми частями липидных молекул.

Оценка стабильности эритроцитов в условиях механического стресса при изменении уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в составе криопротекторных сред проведена на примере глицерола и ПЭГ. Принимая во внимание, что источником роста  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$  могут быть следовые количества ионов в солевых растворах, достигающие концентрации  $10^{-6}$ – $10^{-5}\text{M}$  [31], и случайный вход  $\text{Ca}^{2+}$  через каналоподобные пути в мембранах эритроцитов [10] возникает предположение: удаление  $\text{Ca}^{2+}$  из криопротекторных растворов хелатором двухвалентных катионов ЭДТА приведет к изменениям механической стабильности эритроцитов и повлияет на выживание клеток в процессе криоконсервирования. Вместе с тем повышение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  (1мМ) в криопротекторных средах до уровня физиологических значений может способствовать выяснению роли  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых процессов в поддержании механической устойчивости эритроцитов в стрессовых условиях. Как показали эксперименты, введение  $\text{Ca}^{2+}$  или ЭДТА в ПЭГ-содержащие среды вызывало повышение гемолиза эритроцитов в условиях механического стресса практически в два раза в сравнении с повреждением клеток в немодифицированном растворе (рис. 3). В глицерол-содержащей среде ЭДТА вызывал сходную реакцию, однако  $\text{Ca}^{2+}$  не оказывал значимого влияния на устойчивость клеток (рис. 3). Таким образом, при включении ЭДТА в состав глицерол- и ПЭГ-содержащих сред снижение механической устойчивости эритроцитов происходит независимо от типа КПА, в то время как при добавлении  $\text{Ca}^{2+}$  негативный эффект отмечается только в присутствии ПЭГ. Очевидно, дестабилизирующий эффект ЭДТА на эритроциты связан с влиянием на мембрано-связанный  $\text{Ca}^{2+}$ , а увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в растворах КПА выявляет различия в функционировании  $\text{Ca}^{2+}$ -регулирующих систем в клетках в присутствии данных КПА [4, 6, 7].

Необходимо отметить, что механическая стабильность и деформируемость эритроцитов изменяются независимо друг от друга, поскольку контролируются различными белок-белковыми взаимодействиями [14]. При этом модификация компонентов мембрано-цитоскелетного комплекса, сопровождаемая изменениями свойств мембраны, может быть связана как с физико-химическими факторами среды, так и биохимическими процессами, контролируемые изменением  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ . Влияние  $\text{Ca}^{2+}$  на физические свойства мембран эритроцитов проявляется как в повышении, так

the type of CPAs, while introducing  $\text{Ca}^{2+}$ , a negative effect is only observed in PEG presence. Obviously, a destabilizing activity of EDTA on erythrocytes is associated with its effect on membrane-bound  $\text{Ca}^{2+}$ , and an increase in  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in CPAs solutions reveals the differences in functioning of  $\text{Ca}^{2+}$ -regulating systems in cells in presence of these CPAs [37–39].

Of note is the fact that the erythrocyte membrane mechanical stability and deformability change independently of each other, since they are controlled by different protein-protein interactions [6]. Moreover, the modification of components of membrane-cytoskeleton complex, accompanied by changes in membrane properties, can be operated by both physicochemical factors of medium and biochemical processes, controlled by a change in  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ . The  $\text{Ca}^{2+}$  effect on physical properties of erythrocyte membranes is manifested both in increasing and decreasing the mechanical stability, and implemented in various ways. In particular, the phosphorylation of protein 4.1 by  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent enzyme of protein-kinase C significantly reduced a mechanical stability of membrane due to a decrease in its affinity for spectrin and actin, as well as protein 4.1-mediated



**Рис. 3.** Влияние  $\text{Ca}^{2+}$  и ЭДТА на гемолитические повреждения эритроцитов при механическом стрессе в течение 60 мин в 15%-х растворах криопротекторных агентов, дополненных 150 мМ NaCl, 10 мМ Трис-НСI (рН 7,4); ■ – образцы, не включающие  $\text{Ca}^{2+}$  и ЭДТА; □ – образцы, включающие 1 мМ  $\text{Ca}^{2+}$ ; ▒ – образцы, включающие ЭДТА. \* – значимое повышение гемолиза относительно растворов без включения  $\text{Ca}^{2+}$  и ЭДТА,  $p < 0,05$ .

**Fig. 3.**  $\text{Ca}^{2+}$  effect and EDTA on hemolytic damage of erythrocytes under mechanical stress within 60 min in 15% CPAs solutions, supplemented with 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4); ■ – samples, not including  $\text{Ca}^{2+}$  and EDTA; □ – samples, including 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ; ▒ – samples including EDTA. \* – a significant increase of hemolysis relative to the solutions without  $\text{Ca}^{2+}$  and EDTA inclusion,  $p < 0.05$ .



и снижении механической стабильности и реализуется различными путями. В частности, фосфорилирование белка полосы 4.1  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимым ферментом протеинкиназой С заметно снижало механическую стабильность мембраны в результате уменьшения его сродства к спектрину и актину, а также опосредованной им диссоциации гликофорина С от мембранного скелета [23]. В тоже время повышение  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$  в изотонических условиях при инкубировании эритроцитов с ионофором А23187 в присутствии 0,1 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  существенно снижало уровень гемолиза, индуцированного гидростатическим давлением (200 МПа), что свидетельствовало о повышении стабильности мембран к механическим напряжениям [16]. Кроме того, с помощью атомно-силовой микроскопии показано, что повышение содержания  $\text{Ca}^{2+}$  увеличивает жесткость цитоскелета, и его морфология в нативной клетке становится схожей с цитоскелетом, фиксированным глутаровым альдегидом [21].

Результат влияния  $\text{Ca}^{2+}$  на механические свойства эритроцитов определяется, прежде всего, его концентрацией в клетке, что было продемонстрировано на замкнутых телях эритроцитов, полученных в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  и кальмодулина [36]. В частности, концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в диапазоне 1–100 мкМ существенно снижали механическую стабильность мембраны в присутствии кальмодулина, а при уровне  $\text{Ca}^{2+}$  выше 100 мкМ уменьшалась деформируемость мембран, при этом кальмодулин не оказывал значимого эффекта. Наблюдаемые изменения стабильности мембран [36] связаны с влиянием разных концентраций  $\text{Ca}^{2+}$  и кальмодулина на взаимодействие в тройном комплексе «спектрин-белок полосы 4.1-актин», который является центром объединения соседних спектриновых тетрамеров. Кроме того,  $\text{Ca}^{2+}$  и кальмодулин играют критическую роль в регуляции взаимодействий белка полосы 4.1 с различными трансмембранными партнерами, включая гликофорин С, белок полосы 3 и CD44 [30].

Оценивая влияние  $\text{Ca}^{2+}$  на клетки, важно учитывать, что  $\text{Ca}^{2+}$  не только опосредует регуляцию белок-белковых взаимодействий, но также является триггером сложного биохимического процесса эриптоза. Увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$  на этапе инкубирования эритроцитов с КПА может способствовать механической стабильности мембран и выживанию клеток в условиях замораживания-отогрева, однако различия в уровне изменений  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$  под влиянием глицерола и ПЭГ, вероятно, являются причиной разной жизнеспособности клеток при возвращении в физиологические условия. Ранее было установлено, что ПЭГ и глицерол по-разному влияют на активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы [4, 6, 7],

glycophorin C dissociation from membrane skeleton [16]. At the same time, an increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$  under isotonic conditions during erythrocyte incubation with А23187 ionophore in the presence of 0.1 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  significantly reduced the level of hemolysis, induced by hydrostatic pressure (200 МПа), which indicated an increase in membrane stability to mechanical stresses [9]. In addition, the using of atomic force microscopy demonstrated an increase in  $\text{Ca}^{2+}$  content to augment the cytoskeleton rigidity, and its morphology in a native cell became similar to the cytoskeleton, fixed with glutaraldehyde [14].

The result of  $\text{Ca}^{2+}$  impact on mechanical properties of erythrocytes is most notably determined by its concentration inside cell, that was demonstrated in sealed erythrocyte ghosts, obtained in presence of  $\text{Ca}^{2+}$  and calmodulin [30]. In particular, the  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations within the range of 1–100  $\mu\text{M}$  significantly reduced the membrane mechanical stability in calmodulin presence. Meanwhile, at the  $\text{Ca}^{2+}$  level above 100  $\mu\text{M}$  the membrane deformability decreased, wherein the calmodulin caused no significant effect. The observed changes in membrane stability [30] are associated with the impact of different concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  and calmodulin on the interaction in the ‘spectrin-protein 4.1-actin’ ternary complex, which is the center of association of adjacent spectrin tetramers. In addition,  $\text{Ca}^{2+}$  and calmodulin play a critical role in regulating the interactions of protein 4.1 with different transmembrane partners, including glycophorin C, band 3 and CD44 [23].

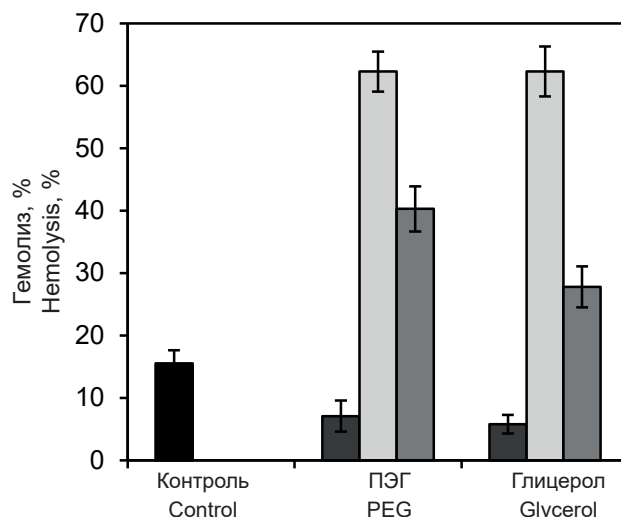
When assessing the  $\text{Ca}^{2+}$  effect on cells, it is important to take into account the fact, that  $\text{Ca}^{2+}$  not only mediates the regulation of protein-protein interactions, but triggers the complex biochemical process of eryptosis as well. An increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$  at the stage of erythrocyte incubation with CPAs may contribute to mechanical stability of membranes and cell survival under freeze-thawing, but the differences in level of the changes in  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$  under glycerol and PEG impact are probably responsible for different cell viability when returning to physiological conditions. The PEG and glycerol were previously found to differently affect the activity of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase [37–39], and the erythrocytes cryopreserved under their protection demonstrated different stability when transferred into physiological conditions. In contrast to glycerol, the PEG hypertonic solutions caused a sharp decrease in  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase erythrocyte activity [37, 39], as a result of which a significant increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$  was possible, since even an isotonic PEG solution caused a 10-fold increase in its entry into cells [12]. Meanwhile, by the data of the Fluo-4 fluorescence intensity, the



а эритроциты, криоконсервированные под их защитой, демонстрируют разную устойчивость при переносе в физиологические условия. В отличие от глицерола, гипертонические растворы ПЭГ вызывали резкое снижение активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТ-разы эритроцитов [4, 7], вследствие чего возможен значительный рост  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ , поскольку даже изотонический раствор ПЭГ вызывал 10-кратное увеличение его входа в клетки [19]. Вместе с тем по данным интенсивности флуоресценции Fluo-4 инкубирование эритроцитов на протяжении 30 мин в гипертоническом растворе глицерола вызывало лишь небольшое увеличение уровня  $\text{Ca}^{2+}$  [18]. Поскольку повышение  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$  в эритроцитах под влиянием ПЭГ не только модифицирует механоэластические свойства мембраны, но также может активировать эриптоз, естественно было предположить, что снижение его поступления в клетку из внеклеточной среды позитивно повлияет на жизнеспособность криоконсервированных клеток при возвращении в физиологические условия. Одним из путей, препятствующих росту  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ , является связывание его хелатором ЭДТА во внеклеточной среде. Однако негативные последствия включения ЭДТА в криопротекторные среды для механической устойчивости эритроцитов свидетельствуют о ее влиянии не только на ионы  $\text{Ca}^{2+}$  в растворе, но, очевидно, и на мембрано-связанный  $\text{Ca}^{2+}$ .

Действительно, как показало молекулярно-динамическое моделирование [32], ионы  $\text{Ca}^{2+}$  тесно связаны с анионными группами липидных молекул и составляют неотъемлемую часть интерфейса мембраны, располагаясь в узкой полосе ( $\sim 10\text{\AA}$ ) вдоль фосфатных групп, а их взаимодействие с липидными молекулами повышает плотность молекулярной упаковки липидов. Поэтому удаление ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из интерфейса мембран эритроцитов хелатором ЭДТА дестабилизирует структуру мембраны и ослабляет механическую устойчивость клеток. Следовательно, включение ЭДТА в криопротекторные среды неприемлемо. Проблему повышения стабильности эритроцитов, криоконсервированных в присутствии ПЭГ, следует, очевидно, решать на основе специфических фармацевтических ингибиторов, блокирующих вход  $\text{Ca}^{2+}$  в клетки.

Анализ механической устойчивости эритроцитов после замораживания-отогрева в присутствии глицерола и ПЭГ показал (рис. 4), что гемолитические повреждения криоконсервированных эритроцитов выше в сравнении с соответствующими показателями клеток, инкубируемых в 15%-х растворах КПА и дополненных 150 мМ NaCl, 10 мМ Трис-НСl (рН 7,4). Удаление глицерола из



**Рис. 4.** Гемолитические повреждения эритроцитов, криоконсервированных под защитой глицерола и ПЭГ, при механическом стрессе в течение 30 мин: ■ – эритроциты, не подвергавшиеся замораживанию; □ – размороженные эритроциты; ▒ – эритроциты, отмытые от криопротекторов после размораживания. Все экспериментальные группы значительно отличаются от контроля,  $p < 0,01$ .

**Fig. 4.** Hemolytic damage in erythrocytes, cryopreserved with glycerol and PEG under mechanical stress for 30 min: ■ – erythrocytes not subjected to freezing; □ – frozen-thawed erythrocytes; ▒ – erythrocytes washed from cryoprotectants after freeze-thawing. \* – all the experimental groups differ significantly from the control,  $p < 0.01$ .

erythrocyte incubation for 30 min in hypertonic glycerol solution caused just a slight increase in  $\text{Ca}^{2+}$  level [11]. Since an increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$  in erythrocytes under PEG effect not only modifies the mechanoelastic properties of membrane, but may activate the eryptosis as well, so it was natural to assume that a decrease in its entry into cell from extracellular medium would positively affect the viability of cryopreserved cells when returning to physiological conditions. One of the pathways, preventing the  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$  augmentation is its binding by EDTA chelator in extracellular medium. However, the negative consequences of EDTA inclusion into cryoprotective media for erythrocyte membrane mechanical stability testifies to its impact not only on  $\text{Ca}^{2+}$  ions in solution, but, obviously, on membrane-bound  $\text{Ca}^{2+}$  as well.

Indeed, as shown by molecular dynamics modeling [25], the  $\text{Ca}^{2+}$  ions are tightly linked to anionic groups of lipid molecules and constitute an integral part of membrane interface, by locating in a narrow band ( $\sim 10\text{\AA}$ ) along the phosphate groups, and their interaction with lipid molecules increases the density of molecular packing of lipids. Therefore, the removal of  $\text{Ca}^{2+}$  ions from erythrocyte membrane interface by EDTA chelator desta-



криоконсервированных эритроцитов приближало уровень гемолитических повреждений клеток в условиях механического стресса к контрольному, хотя устойчивость их была все же ниже, чем в контроле. Очевидно, серьезных нарушений свойств мембрано-цитоскелетного комплекса эритроцитов, криоконсервированных в присутствии глицерола, не происходит, что позволяет использовать такие клетки в клинической практике, несмотря на то, что срок их жизни в русле крови может быть меньше, чем нативных. Вместе с тем криоконсервированные под защитой ПЭГ эритроциты, даже после удаления криопротектора из клеточной суспензии, демонстрировали высокий уровень гемолиза при механическом стрессе, который значимо отличался не только от контроля, но и от уровня гемолиза криоконсервированных эритроцитов, отмытых от глицерола. Снижение механической устойчивости криоконсервированных под защитой ПЭГ эритроцитов может указывать как на сублетальные повреждения мембран в процессе замораживания-отогрева [3], так и на негативные последствия развития биохимических реакций, активированных высокой  $[Ca^{2+}]_{in}$ . Следовательно, перенос таких клеток в русле крови реципиента мог бы иметь серьезные последствия для его здоровья. Тем не менее, принимая во внимание преимущества безотмывочного способа криоконсервирования клеток под защитой ПЭГ, целесообразность дальнейших исследований механизмов модификации компонентов мембрано-цитоскелетного комплекса под влиянием КПА и замораживания для повышения устойчивости клеток в физиологических условиях не вызывает сомнений. При этом оценка механической устойчивости криоконсервированных эритроцитов может применяться в клинической практике как функциональный тест.

### Выводы

1. Рост концентрации солей во внеклеточной среде приводит к снижению механической стабильности эритроцитов, указывая на возможность повреждения клеток в ходе замораживания-отогрева за счет снижения механической устойчивости мембраны.

2. Увеличение гемолитических повреждений эритроцитов при механическом стрессе в присутствии гипертонических растворов КПА, не содержащих электролитов, свидетельствует о важной роли электростатически контролируемых взаимодействий в мембране для их модификации в присутствии КПА.

3. Устойчивость эритроцитов при механическом стрессе в присутствии глицерола и ПЭГ

bilizes the membrane structure and weakens a mechanical stability of cells. Therefore, the introduction of EDTA into cryoprotective media is unacceptable. The task of increasing the stability of erythrocytes, cryopreserved in the PEG presence should obviously be solved basing on specific pharmaceutical inhibitors that block  $Ca^{2+}$  entry into cells.

Analysis of erythrocyte mechanical stability after their freeze-thawing in glycerol and PEG presence showed (Fig. 4) the hemolytic damages in cryopreserved erythrocytes to be higher as compared with the corresponding indices of cells incubated with 15% CPAs solutions, supplemented with 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4). The removal of glycerol from cryopreserved erythrocytes approached the level of hemolytic damages of cells under mechanical stress to the control, although their resistance was still lower than in the native cells. Obviously, no serious disorders of properties in membrane-cytoskeletal complex of the erythrocytes, cryopreserved in glycerol presence occur, that allows using these cells in clinical practice, despite the fact that their life span in bloodstream may be shorter vs. native ones. At the same time, the erythrocytes, cryopreserved under PEG protection, even after cryoprotectant removal from cell suspension, showed a high hemolysis level under mechanical stress, which significantly differed not only from the control, but the hemolysis level of cryopreserved erythrocytes washed free of glycerol as well. A decrease in mechanical stability of erythrocytes cryopreserved under PEG protection may indicate both sublethal membrane damages during freeze-thawing [36] and negative consequences of development of biochemical reactions, activated by high  $[Ca^{2+}]_{in}$ . Consequently, the transfer of these cells into recipient's bloodstream could have serious consequences for health. Nevertheless, taking into account the advantages of no-wash method of cell cryopreservation under PEG protection, the expediency of further studies of modification mechanisms for the membrane-cytoskeletal complex components under CPAs effect and freezing to increase the cell stability under physiological conditions, is beyond doubt. Moreover, the assessment of mechanical stability of cryopreserved erythrocytes may be used in clinical practice as a functional test.

### Conclusions

1. An increase in salt concentration in extracellular medium entails a decrease in erythrocyte membrane mechanical stability, indicating a possible cell damage during freeze-thawing due to a decrease in mechanical stability of membrane.



зависит от наличия ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в среде и может определяться влиянием защитных соединений на активность  $\text{Ca}^{2+}$ -регулирующих мембранных систем.

4. Механическая устойчивость эритроцитов, криоконсервированных в присутствии глицерола, подтверждает отсутствие серьезных нарушений мембрано-цитоскелетного комплекса, что позволяет использовать такие клетки в клинической практике. Снижение механической устойчивости эритроцитов, криоконсервированных под защитой ПЭГ, может указывать на сублетальные повреждения мембран.

### Литература

1. Гулевский АК, Рязанцев ВВ, Кукушкин АИ. Роль трансмембранного потенциала в нарушении барьерных свойств мембран эритроцитов в процессе криоконсервирования. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 1985; 100(12): 690–1.
2. Землянских НГ. Влияние криопротекторных веществ на механическую устойчивость и геометрические параметры эритроцитов человека. Биофизика. 2018; 63(1): 94–105.
3. Землянских НГ, Бабийчук ЛА. Влияние криоконсервирования в присутствии криопротектора ПЭГ-1500 на поверхностные характеристики эритроцитов. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2015; 25(2): 104–13.
4. Землянских НГ, Бабийчук ЛА. Изменения активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы эритроцитов под влиянием ПЭГ-1500 и низких температур. Цитология. 2016; 58(12): 964–70.
5. Землянских НГ, Коваленко ИФ, Бабийчук ЛА. Особенности модификации геометрических параметров и изменений осмотической хрупкости эритроцитов человека под влиянием сахарозы и ПЭГ-1500. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2017; 27(4): 296–310.
6. Землянских НГ, Кофанова ОА. Модификация активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы эритроцитов человека под влиянием глицерола: роль кальмодулина. Биохимия. 2006; 71(8): 1112–8.
7. Землянских НГ, Хоменко МВ. Активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы эритроцитов человека в гипертонических средах при низкой и физиологической температуре. Биологические Мембраны. 2006; 23(6): 484–92.
8. Шпакова НМ, Орлова НВ, Ніпот ОЕ, Александрова ДІ. Порівняльнє вивчення дії механічного стресу на еритроцити людини і тварин. Фізіологічний журнал. 2015; 61 (3): 75–80.
9. Balasubramanian SK, Wolkers WF, Bischof JC. Membrane hydration correlates to cellular biophysics during freezing in mammalian cells. Biochim Biophys Acta. 2009; 1788(5): 945–53.
10. Baunbaek M, Bennekou P. Evidence for a random entry of  $\text{Ca}^{2+}$  into human red cells. Bioelectrochemistry. 2008; 73(2): 145–50.
11. Bernhardt I, Weiss E. Passive membrane permeability for ions and the membrane potential. In: Bernhardt I, Ellory JC, editors. Red cell membrane transport in health and disease. Berlin, Heidelberg: Springer; 2003. p. 84–109.
12. Ciana A, Achilli C, Balduini C, Minetti G. On the association of lipid rafts to the spectrin skeleton in human erythrocytes. Biochim Biophys Acta. 2011; 1808(1): 183–90.
13. Ciana A, Balduini C, Minetti G. Detergent-resistant membranes in human erythrocytes and their connection to the membrane-skeleton. J Biosci. 2005; 30(3): 317–28.

2. An increase in hemolytic damages of erythrocytes under mechanical stress in the presence of electrolyte-free hypertonic solutions of CPAs testifies to an important role of electrostatically controlled interactions in membrane for their modification in CPAs presence.

3. The erythrocyte stability under mechanical stress in glycerol and PEG presence depends on  $\text{Ca}^{2+}$  ion availability in the medium and may be determined by the impact of protective compounds on activity of  $\text{Ca}^{2+}$ -regulating membrane systems.

4. The mechanical stability of erythrocytes, cryopreserved in glycerol presence confirms the absence of serious disorders of membrane-cytoskeletal complex, which allows using these cells in clinical practice. A decrease in mechanical stability of erythrocytes, cryopreserved under PEG protection may indicate the sublethal membrane damages.

### References

1. Balasubramanian SK, Wolkers WF, Bischof JC. Membrane hydration correlates to cellular biophysics during freezing in mammalian cells. Biochim Biophys Acta. 2009; 1788(5): 945–53.
2. Baunbaek M, Bennekou P. Evidence for a random entry of  $\text{Ca}^{2+}$  into human red cells. Bioelectrochemistry. 2008; 73(2): 145–50.
3. Bernhardt I, Weiss E. Passive membrane permeability for ions and the membrane potential. In: Bernhardt I, Ellory JC, editors. Red cell membrane transport in health and disease. Berlin, Heidelberg: Springer; 2003. p. 84–109.
4. Ciana A, Achilli C, Balduini C, Minetti G. On the association of lipid rafts to the spectrin skeleton in human erythrocytes. Biochim Biophys Acta. 2011; 1808(1): 183–90.
5. Ciana A, Balduini C, Minetti G. Detergent-resistant membranes in human erythrocytes and their connection to the membrane-skeleton. J Biosci. 2005; 30(3): 317–28.
6. Chasis JA, Mohandas N. Erythrocyte membrane deformability and stability: two distinct membrane properties that are independently regulated by skeletal protein associations. J Cell Biol. 1986; 103(2): 343–50.
7. Esmann M, Fedosova NU, Marsh D. Osmotic stress and viscous retardation of the  $\text{Na,K}^+$  ATPase ion pump. Biophys J. 2008; 94(7): 2767–76.
8. Gulevskii AK, Riazantsev VV, Kukushkin AI. [Role of the transmembrane potential in impairing the barrier properties of erythrocyte membranes during cryopreservation] Biull Eksp Biol Med. 1985; 100(12): 690–1. Russian.
9. Harano T, Yamaguchi T, Kimoto E. Hemolytic properties of  $\text{Ca}^{2+}$ -treated human erythrocytes under hydrostatic pressure. J Biochem. 1994; 116(4): 773–7.
10. Ishiguro H, Rubinsky B. Mechanical interactions between ice crystals and red blood cells during directional solidification. Cryobiology. 1994; 31(5): 483–500.
11. Kofanova OA, Zemlyanskikh NG, Ivanova L, Bernhardt I. Changes in the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  content in human red blood cells in the presence of glycerol. Bioelectrochemistry. 2008; 73(2): 151–4.



14. Chasis JA, Mohandas N. Erythrocyte membrane deformability and stability: two distinct membrane properties that are independently regulated by skeletal protein associations. *J Cell Biol.* 1986; 103(2): 343–50.
15. Esmann M, Fedosova NU, Marsh D. Osmotic stress and viscous retardation of the Na, K<sup>-</sup> ATPase ion pump. *Biophys J.* 2008; 94(7): 2767–76.
16. Harano T, Yamaguchi T, Kimoto E. Hemolytic properties of Ca<sup>2+</sup>-treated human erythrocytes under hydrostatic pressure. *J Biochem.* 1994; 116(4): 773–7.
17. Ishiguro H, Rubinsky B. Mechanical interactions between ice crystals and red blood cells during directional solidification. *Cryobiology.* 1994; 31(5): 483–500.
18. Kofanova OA, Zemlyanskikh NG, Ivanova L, Bernhardt I. Changes in the intracellular Ca<sup>2+</sup> content in human red blood cells in the presence of glycerol. *Bioelectrochemistry.* 2008; 73(2): 151–4.
19. Kucherenko YV, Bernhardt I. The study of Ca<sup>2+</sup> influx in human erythrocytes in isotonic polyethylene (glycol) 1500 (PEG-1500) and sucrose media. *Ukr Biokhim Zh.* 2006; 78(6): 46–52.
20. Kummerow D, Hamann J, Browning JA, et al. Variations of intracellular pH in human erythrocytes via K<sup>+</sup>(Na<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> exchange under low ionic strength conditions. *J Membrane Biol.* 2000; 176(3): 207–16.
21. Liu F, Mizukami H, Sarnaik S, Ostafin A. Calcium-dependent human erythrocyte cytoskeleton stability analysis through atomic force microscopy. *J Struct Biol.* 2005; 150(2): 200–10.
22. Logisz CC, Hovis JS. Effect of salt concentration on membrane lysis pressure. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1717(2): 104–8.
23. Manno S, Takakuwa Y, Mohandas N. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by protein 4.1 phosphorylation. *J Biol Chem.* 2005; 280(9): 7581–7.
24. Mazur P, Cole KW. Roles of unfrozen fraction, salt concentration, and changes in cell volume in the survival of frozen human erythrocytes. *Cryobiology.* 1989; 26(1): 1–29.
25. Moersdorf D, Egee S, Hahn C, et al. Transmembrane potential of red blood cells under low ionic strength conditions. *Cell Physiol Biochem.* 2013; 31(6): 875–82.
26. Mohandas N, Chasis JA. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin Hematol.* 1993; 30(3): 171–92.
27. Muldrew K. The salting-in hypothesis of post-hypertonic lysis. *Cryobiology.* 2008; 57(3): 251–6.
28. Muldrew K, Schachar J, Cheng P, et al. The possible influence of osmotic poration on cell membrane water permeability. *Cryobiology.* 2009; 58(1): 62–8.
29. Navarro-Prigent MJ, Séguin I, Boivin P, Dhery D. Study of human erythrocyte membrane protein interactions by selective solubilization of Triton-skeletons. *Biol Cell.* 1995; 83(1): 33–8.
30. Nunomura W, Takakuwa Y. Regulation of protein 4.1R interactions with membrane proteins by Ca<sup>2+</sup> and calmodulin. *Front Biosci [internet].* 2006 [Cited 01.03.2018]; 11:1522–39. Доступно на <https://www.bioscience.org/2006/v11/af/1901/fulltext.htm>.
31. Patton C, Thompson S, Epel D. Some precautions in using chelators to buffer metals in biological solutions. *Cell Calcium.* 2004; 35(5): 427–31.
32. Pedersen UR, Leidy C, Westh P, Peters GH. The effect of calcium on the properties of charged phospholipid bilayers. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1758(5): 573–82.
33. Ruan R, Zou L, Sun S, et al. Cell blebbing upon addition of cryoprotectants: a self-protection mechanism. *PLoS One [internet].* 2015 [Cited 01.03.2018]; 10(4): e0125746. Доступно на <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0125746>
34. Saragusty J, Gacitua H, Rozenboim I, Arav A. Do physical forces contribute to cryodamage? *Biotechnol Bioeng.* 2009; 104(4): 719–28.
12. Kucherenko YV, Bernhardt I. The study of Ca<sup>2+</sup> influx in human erythrocytes in isotonic polyethylene (glycol) 1500 (PEG-1500) and sucrose media. *Ukr Biokhim Zh.* 2006; 78(6): 46–52.
13. Kummerow D, Hamann J, Browning JA, Wilkins R, Ellory JC, Bernhardt I. Variations of intracellular pH in human erythrocytes via K<sup>+</sup>(Na<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> exchange under low ionic strength conditions. *J Membrane Biol.* 2000; 176(3): 207–16.
14. Liu F, Mizukami H, Sarnaik S, Ostafin A. Calcium-dependent human erythrocyte cytoskeleton stability analysis through atomic force microscopy. *J Struct Biol.* 2005; 150(2): 200–10.
15. Logisz CC, Hovis JS. Effect of salt concentration on membrane lysis pressure. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1717(2): 104–8.
16. Manno S, Takakuwa Y, Mohandas N. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by protein 4.1 phosphorylation. *J Biol Chem.* 2005; 280(9): 7581–7.
17. Mazur P, Cole KW. Roles of unfrozen fraction, salt concentration, and changes in cell volume in the survival of frozen human erythrocytes. *Cryobiology.* 1989; (1): 1–29.
18. Moersdorf D, Egee S, Hahn C, et al. Transmembrane potential of red blood cells under low ionic strength conditions. *Cell Physiol Biochem.* 2013; 31(6): 875–82.
19. Mohandas N, Chasis JA. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin Hematol.* 1993; 30(3): 171–92.
20. Muldrew K. The salting-in hypothesis of post-hypertonic lysis. *Cryobiology.* 2008; 57(3): 251–6.
21. Muldrew K, Schachar J, Cheng P, et al. The possible influence of osmotic poration on cell membrane water permeability. *Cryobiology.* 2009; 58(1): 62–8.
22. Navarro-Prigent MJ, Séguin I, Boivin P, Dhery D. Study of human erythrocyte membrane protein interactions by selective solubilization of Triton-skeletons. *Biol Cell.* 1995; 83(1): 33–8.
23. Nunomura W, Takakuwa Y. Regulation of protein 4.1R interactions with membrane proteins by Ca<sup>2+</sup> and calmodulin. *Front Biosci [internet].* 2006 [Cited 01.03.2018]; 11:1522–39. Доступно на <https://www.bioscience.org/2006/v11/af/1901/fulltext.htm>.
24. Patton C, Thompson S, Epel D. Some precautions in using chelators to buffer metals in biological solutions. *Cell Calcium.* 2004; 35(5): 427–31.
25. Pedersen UR, Leidy C, Westh P, Peters GH. The effect of calcium on the properties of charged phospholipid bilayers. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1758(5): 573–82.
26. Ruan R, Zou L, Sun S, et al. Cell blebbing upon addition of cryoprotectants: a self-protection mechanism. *PLoS One [internet].* 2015 [Cited 01.03.2018]; 10(4): e0125746. Доступно на <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0125746>
27. Saragusty J, Gacitua H, Rozenboim I, Arav A. Do physical forces contribute to cryodamage? *Biotechnol Bioeng.* 2009; 104(4): 719–28.
28. Shpakova NM, Orlova NV, Nipot EE, Aleksandrova DI. [Comparative study of mechanical stress effect on human and animal erythrocytes]. *Fiziol Zh.* 2015; 61(3): 75–80. Ukrainian.
29. Svetina S, Kuzman D, Waugh RE, et al. The cooperative role of membrane skeleton and bilayer in the mechanical behaviour of red blood cells. *Bioelectrochemistry.* 2004; 62(2): 107–13.
30. Takakuwa Y, Ishibashi T, Mohandas N. Regulation of red cell membrane deformability and stability by skeletal protein network. *Biorheology.* 1990; 27(3-4): 357–65.
31. Takamatsu H, Rubinsky B. Viability of deformed cells. *Cryobiology.* 1999; 39(3): 243–51.
32. Vácha R, Berkowitz ML, Jungwirth P. Molecular model of a cell plasma membrane with an asymmetric multicomponent composition: water permeation and ion effects. *Biophys J.* 2009; 96(11): 4493–501.



35. Svetina S, Kuzman D, Waugh RE et al. The cooperative role of membrane skeleton and bilayer in the mechanical behaviour of red blood cells. *Bioelectrochemistry*. 2004; 62(2): 107–13.
36. Takakuwa Y, Ishibashi T, Mohandas N. Regulation of red cell membrane deformability and stability by skeletal protein network. *Biorheology*. 1990; 27(3–4): 357–65.
37. Takamatsu H, Rubinsky B. Viability of deformed cells. *Cryobiology*. 1999; 39(3): 243–51.
38. Vácha R, Berkowitz ML, Jungwirth P. Molecular model of a cell plasma membrane with an asymmetric multicomponent composition: water permeation and ion effects. *Biophys J*. 2009; 96(11): 4493–501.
39. Verstraeten SV, Mackenzie GG, Oteiza PI. The plasma membrane plays a central role in cells response to mechanical stress. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1798(9): 1739–49.
40. Viallat A, Abkarian M. Red blood cell: from its mechanics to its motion in shear flow. *Int J Lab Hematol*. 2014; 36(3): 237–43.
33. Verstraeten SV, Mackenzie GG, Oteiza PI. The plasma membrane plays a central role in cells response to mechanical stress. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1798(9): 1739–49.
34. Viallat A, Abkarian M. Red blood cell: from its mechanics to its motion in shear flow. *Int J Lab Hematol*. 2014; 36(3): 237–43.
35. Zemlianskykh NG. The effects of cryoprotective substances on the mechanical stability and geometric parameters of human erythrocytes. *Biophysics*. 2018; 63(1): 66–76.
36. Zemlianskykh NG, Babiychuk LA. Cryopreservation in presence of PEG-1500 affects erythrocyte surface characteristics. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2015; 25(2): 104–13.
37. Zemlianskykh NG, Babiychuk LA. The changes in erythrocyte Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity induced by PEG-1500 and low temperatures. *Cell and Tissue Biology*. 2017; 11(2): 104–10.
38. Zemlyanskikh NG, Khomenko MV. [Human erythrocyte Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity in hypertonic media at low and physiological temperatures]. *Biologicheskie Membrany* 2006; 23(6): 484–92. Russian.
39. Zemlyanskikh NG, Kofanova OA. Modulation of human erythrocyte Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity by glycerol: the role of calmodulin. *Biochemistry (Mosc)*. 2006; 71(8): 900–5.
40. Zemlianskykh NG, Kovalenko IF, Babiychuk LA. Peculiarities of modifications in geometric parameters and changes in osmotic fragility of human erythrocytes following their exposure in sucrose and PEG-1500 solutions. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2017; 27(4): 296–310.

