

ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ЧУТЛИВОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ ЩУРІВ

Л. В. Коба¹, О. Є. Ніпот², О. О. Шапкина², А. Є. Жуйкова¹, В. А. Бондаренко¹
nipotel71@gmail.com

¹Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна,
пл. Свободи, 4, м. Харків, 61022, Україна

²Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,
вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61016, Україна

У роботі були досліджені вікові особливості чутливості еритроцитів 1- та 12-місячних щурів до гіпертонічних умов середовища після їх температурної модифікації за +49 °С та/чи витримки у розчинах сахарози.

Отримані дані показали, що температурна модифікація клітин підвищує їх чутливість до дії гіпертонічного стресу. При цьому більш чутливими є еритроцити 1-місячних щурів. Попередня інкубація в гіпертонічній сахарозі від 0,4 до 0,8 М значно збільшує чутливість до гіпертонічного шоку як 1-місячних, так і 12-місячних щурів. Збільшення часу інкубації в сахарозі також підвищує чутливість еритроцитів обох вікових груп до дії гіпертонічного розчину — у цьому випадку більш чутливими також виявилися клітини 1-місячних тварин. Припускається, що денатурація анкирину за температури +49 °С призводить до часткового відкріплення спектрина від мембрани і підвищує чутливість еритроцитів 1-місячних щурів до гіпертонічного стресу. Показано, що для нативних клітин ступінь сенсибілізації еритроцитів щурів різного віку до гіпертонічного впливу практично не залежить від попередньої інкубації в розчинах сахарози, тоді як після попередньої температурної модифікації еритроцитів за +49 °С еритроцити 1-місячних щурів стають чутливішими. Отже, низька іонна сила однаково впливає на клітини щурів різного віку, що демонструє повну сформованість комплексу спектрин-актин у 1-місячних щурів. Усунення зв'язку спектрин-анкірин через термоденатурацію призводить до підвищення чутливості тільки 1-місячних тварин. Це вказує на наявність додаткових зв'язків в еритроцитах дорослих тварин, які з'являються як заміна частини зв'язків спектрин-анкірин у постнатальний період онтогенезу.

Таким чином, осмотична стійкість еритроцитів (клітин еритроцитарної популяції) щурів на ранніх етапах онтогенезу визначається станом структурно-функціонального комплексу спектрин-анкірин, а зрілі клітини відрізняються різноманітнішим комплексом зв'язків плазматична мембрана-цитоскелет, що зумовлює їх стійкість до обраних модифікацій.

Ключові слова: ЩУРИ, ЕРИТРОЦИТИ, ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ, ТЕРМОДЕНАТУРАЦІЯ, ГІПЕРТОНІЧНИЙ ШОК, РОЗЧИНИ САХАРОЗИ, АНКИРИН, СПЕКТРИН, ЦИТОСКЕЛЕТ

THE AGE FEATURES OF RAT ERYTHROCYTES

L. V. Koba¹, O. E. Nipot², O. O. Shapkina², A. E. Zhujkova¹, V. A. Bondarenko¹
nipotel71@gmail.com

¹V. N. Karazin Kharkiv National University,
4 Svobody sq., Kharkiv 61022, Ukraine

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine NAS of Ukraine,
23 Pereyaslavska str., Kharkiv 61016, Ukraine

In this work, age features of sensitivity of the 1- and 12-month rats' erythrocytes to hypertonic environment conditions after their temperature modification at +49 °C and/or incubation in sucrose solutions were investigated.

The obtained data shows that temperature modification of cells increases their sensitivity to hypertonic stress. In this case, the red cells of the 1-month rats are more sensitive. Pre-incubation in hypertonic sucrose from 0.4 to 0.8 M significantly increases sensitivity to hypertonic shock in both 1 and 12-month-old rats. Increasing the incubation time in sucrose also increases the sensitivity of erythrocytes in both age groups to the influence of the hypertonic solution. Additionally, the cells of 1-month-old animals became more sensitive. It is believed that denaturation of ankyrin at a temperature of 49 °C leads to partial detachment of the spectrin from the membrane and increases the sensitivity of erythrocytes of 1-month-old rats to hypertonic stress. It has been shown that for

native cells, the erythrocytes' degree of sensitivity different aged rats to hypertonic stress does not depend on previous incubation in solutions of sucrose, whereas after the previous temperature modification at 49 °C, erythrocytes of 1-month rats become more sensitive. Consequently, low ionic strength equally affects the cells of rats of different ages, which demonstrates the complete formation of the spectrin-actin complex in 1-month-old rats. Removal of the spectrin-ankyrin interaction via thermodenaturation leads to an increase in the sensitivity exclusively in 1 month-old animals. This indicates the presence of additional links in erythrocytes of adult animals that appear during the process of organism's maturation as a substitute for the spectrin-ankyrin bonds.

Thus, the erythrocytes osmotic stability (cells of the erythrocytic population) of rats in the early stages of ontogenesis is determined by the state of the structural-functional complex spectrin-ankyrin, while mature cells demonstrate a more diverse complex of plasma membrane-cytoskeleton ligaments, which determine their resistance to selected modifications.

Keywords: RATS ERYTHROCYTE, AGE FEATURES, THERMODENATURATION, HYPERTONIC SHOCK, SUCROSE SOLUTIONS, ANKYRIN, SPECTRIN, CYTOSKELETON

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС

Л. В. Коба¹, О. Е. Нупот², О. А. Шапкина², А. Е. Жуйкова¹, В. А. Бондаренко¹
nipotel71@gmail.com

¹Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина,
пл. Свободы, 4, Харьков, 61022, Украина

²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,
ул. Переяславская 23, г. Харьков, 61016, Украина

В работе были исследованы возрастные особенности чувствительности эритроцитов 1- и 12-месячных крыс к гипертоническим условиям среды после их температурной модификации при 49 °C и/или выдержке в растворах сахарозы.

Полученные данные показали, что температурная модификация клеток повышает их чувствительность к действию гипертонического стресса. При этом более чувствительными являются эритроциты 1-месячных крыс. Предыдущая инкубация в гипертонической сахарозе от 0,4 до 0,8 М значительно увеличивает чувствительность к гипертоническому шоку как 1-месячных, так и 12-месячных крыс. Увеличение времени инкубации в сахарозе также повышает чувствительность эритроцитов обеих возрастных групп к действию гипертонического раствора — в этом случае более чувствительными также оказались клетки 1-месячных животных. Предполагается, что денатурация анкирина при температуре +49 °C приводит к частичному откреплению спектрина от мембраны, что повышает чувствительность эритроцитов 1-месячных крыс к гипертоническому стрессу. Показано, что для нативных клеток степень сенсибилизации эритроцитов крыс разного возраста к гипертоническому влиянию практически не зависит предварительной инкубации в растворах сахарозы, в то время как после предварительной температурной модификации эритроцитов при +49 °C эритроциты 1-месячных крыс становятся более чувствительными. Итак, низкая ионная сила одинаково воздействует на клетки крыс разного возраста, что демонстрирует полную сформированность комплекса спектрин-актин у 1-месячных крыс. Устранение путём термоденатурации связи спектрин-анкирин приводит к повышению чувствительности только 1-месячных животных. Это указывает на наличие дополнительных связей в эритроцитах взрослых животных, которые появляются как замена части связей спектрин-анкирин в процессе взросления организма.

Таким образом, осмотическая устойчивость эритроцитов (клеток эритроцитарной популяции) крыс на ранних этапах онтогенеза определяется состоянием структурно-функционального комплекса спектрин-анкирин, а зрелые клетки отличаются более разнообразным комплексом связей плазматическая мембрана-цитоскелет, что обуславливает их устойчивость к выбранным модификациям.

Ключевые слова: КРЫСЫ, ЭРИТРОЦИТЫ, ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ, ТЕРМОДЕНАТУРАЦИЯ, ГИПЕРТОНИЧЕСКИЙ ШОК, РАСТВОРЫ САХАРОЗЫ, АНКИРИН, СПЕКТРИН, ЦИТОСКЕЛЕТ

Старіння — складний і багатофакторний фізіологічний процес, пов'язаний зі змінами гемореологічних параметрів, а саме:

в'язкості плазми, здатності еритроцитів до деформації, що впливає на постачання Оксигену до всіх тканин та органів. Численні досліджен-

ня показали, що фізіологічні зміни під час старіння зумовлюють підвищений ризик захворюваності і смертності при серцево-судинних розладах [7, 8]. Цей факт ще раз підкреслює важливість геронтологічних досліджень.

Щури — найпоширеніші лабораторні тварини в численних біомедичних експериментах, оскільки вони визнані найкращою модельною системою ссавців. Зазвичай у дослідженнях використовують молодих тварин з огляду на доступність і низьку вартість; експерименти, проведені на старших тваринах, можуть надати корисну інформацію щодо багатьох пов'язаних з віком проблем і захворювань людини [10, 16, 17].

Відомо, що стан плазматичної мембрани визначає низку властивостей і функцій клітин різної структурно-функціональної спеціалізації. Тому вікові зміни, які розвиваються на її рівні, можуть мати вирішальне значення для реалізації закономірностей та механізмів підтримання гомеостазу не тільки на клітинному, але й на інших рівнях організації тваринного організму. Варто зауважити, що особливості вікового статусу клітини можуть мати латентний характер, що визначає запас їх функціональної пластичності, і проявляти себе саме в умовах поза фізіологічної норми. Так, порушення фізико-хімічних властивостей і метаболізму еритроцитів спостерігається при досить широкому спектрі патологічних станів; але ці зміни можуть носити неявний характер і не виявляються звичайними рутинними методами. У цьому випадку дія екстремального фактора на еритроцити *in vitro* дозволить оцінити їх адаптивний потенціал і виявити ймовірні структурно-функціональні зміни.

Відомо, що стійкість еритроцитів ссавців до нефізіологічних осмотичних і температурних умов середовища залежить від стану структурно-функціонального комплексу цитоскелету та плазматичної мембрани [12, 14, 15]. Суттєву роль у цьому відіграють протеїни, які визначають взаємозв'язки між компонентами цієї структури. Модифікація цього комплексу може виявити компоненти, відповідальні за вікові зміни на клітинному рівні.

Метою нашої роботи було дослідити вікові особливості чутливості еритроцитів 1- та

12-місячних щурів до гіпертонічних умов середовища після їх температурної модифікації за +49 °C та/чи витримки у розчинах сахарози.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на еритроцитах самців щурів лінії *Wistar* 1- і 12-місячного віку. Кров одержували під час декапітації тварин під легким ефірним наркозом (стабілізатор гепарин, 500 од/мл). Роботу з тваринами проводили відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах» (V Національний конгрес з біоетики, Київ, 2013), узгоджених з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Еритроцити відмивали 0,01 М Na-фосфатним буфером, що містить 0,15 М NaCl, при pH=7,4 центрифугуванням впродовж 5 хв, зберігали за температури 0 °C не більше години.

Температурну денатурацію проводили згідно зі стандартними методиками. Для цього 50 % суспензію клітин витримували 15 хв за температури +49 °C.

Нативні та модифіковані еритроцити спочатку витримували в гіпертонічних розчинах сахарози з різною концентрацією неелектроліту (0,27–1,0 М) при +37 °C протягом 2, 10, 30 та 60 хв. Після чого клітини переносили у 4,0 М NaCl на 0,01 моль/л Na-фосфатном буфері, pH=7,4, за температури +37 °C на 5 хв.

Стійкість еритроцитів в гіпертонічних умовах середовища оцінювали за вмістом гемоглобіну у супернатанті зразків після центрифугуванням при 3000 об/хв впродовж 3 хв. Вміст гемоглобіну визначали спектрофотометрично при 543 нм, виражали у відсотках щодо контрольного зразка. Результати дослідження оброблені стандартними методами варіаційної статистики.

Результати й обговорення

На рис. 1–3 наведений рівень пошкодження еритроцитів щурів в гіпертонічному середовищі залежно від концентрації сахарози у середовищі передінкубації. Видно, що тем-

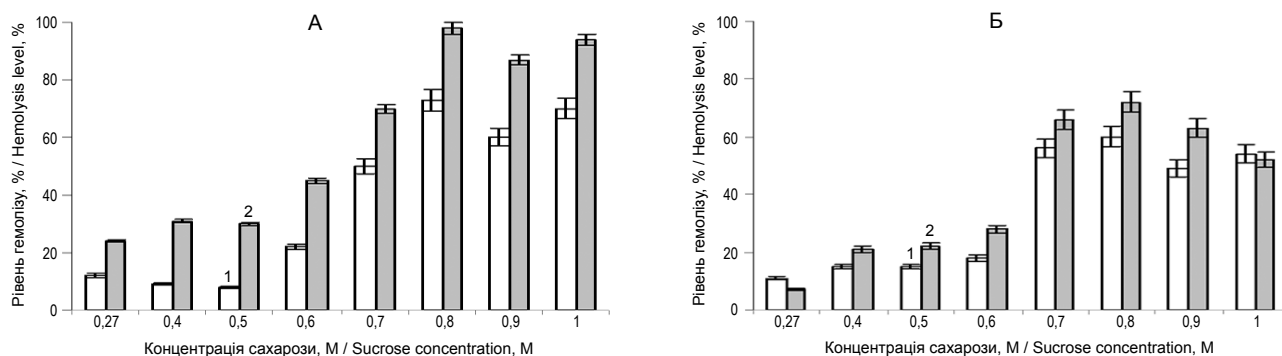


Рис. 1. Рівень пошкодження еритроцитів щурів в 4 М NaCl залежно від концентрації сахарози у середовищі передінкубації.
1 — контрольні клітини; 2 — клітини, які пройшли обробку температурою +49 °С.
Час витримки у сахарозному середовищі — 2 хв. А — 1-місячні щури; Б — 12-місячні щури.

Fig. 1. The level of damage to rats' erythrocytes in 4 M NaCl depending on the concentration of sucrose in the pre-incubation medium.
1 — control cells; 2 — cells treated with a temperature of 49 °C.

Incubation time in sucrose medium is 2 min. A — 1-month-old rats; B — 12-month-old rats.

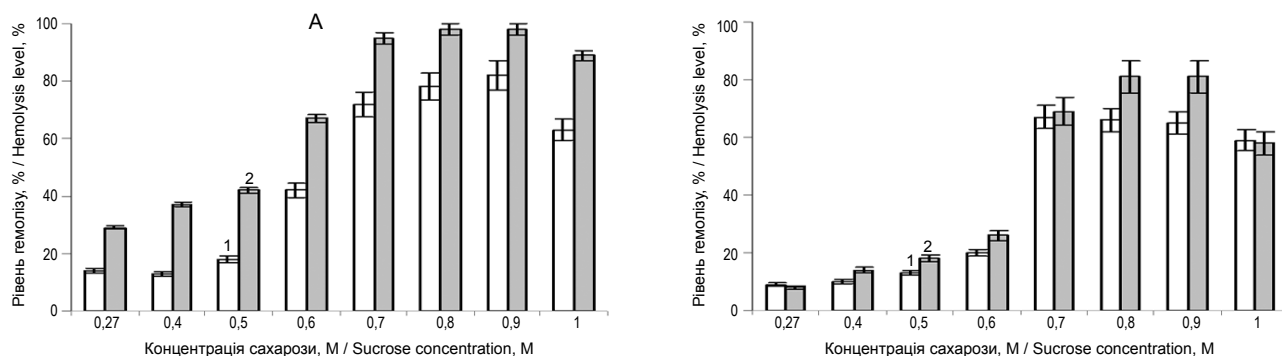


Рис. 2. Рівень пошкодження еритроцитів щурів в 4 М NaCl залежно від концентрації сахарози в середовищі передінкубації.
1 — контрольні клітини; 2 — клітини, які пройшли обробку температурою +49 °С.
Час витримки у сахарозному середовищі — 10 хв. А — 1-місячні щури; Б — 12-місячні щури.

Fig. 2. The level of damage to rats' erythrocytes in 4 M NaCl depending on the concentration of sucrose in the pre-incubation medium.
1 — control cells; 2 cells treated with a temperature of 49 °C.

Incubation time in sucrose medium is 10 min. A — 1-month-old rats; B — 12-month-old rats.

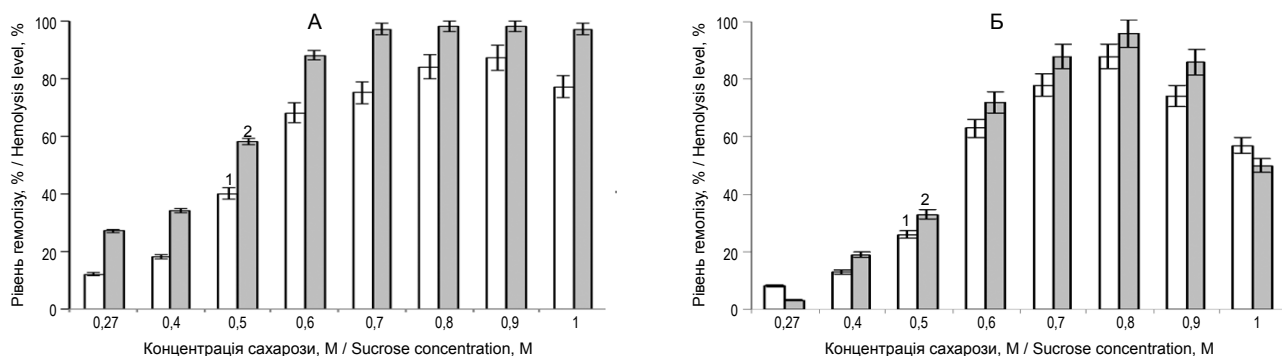


Рис. 3. Рівень пошкодження еритроцитів щурів в 4 М NaCl залежно від концентрації сахарози у середовищі передінкубації.
1 — контрольні клітини; 2 — клітини, які пройшли обробку температурою +49 °С.
Час витримки у сахарозному середовищі — 30 хв. А — 1-місячні щури; Б — 12-місячні щури.

Fig. 3. The level of damage to rats' erythrocytes in 4 M NaCl depending on the concentration of sucrose in the pre-incubation medium.
1 — control cells; 2 cells treated with a temperature of +49 °C.

Incubation time in sucrose medium for 30 min. A — 1-month-old rats; B — 12-month-old rats.

пературна модифікація клітин за температури +49 °C значно змінює їх чутливість до гіпертонічного шоку. На рис. 1 представлений рівень гіпертонічного гемолізу еритроцитів щурів двох вікових груп залежно від концентрації сахарози у середовищі передінкубації. Час інкубації в сахарозі становить 2 хв. Рис. 2 та 3 відрізняються тривалішим витримуванням у розчині сахарози — 10 та 30 хв відповідно.

Отримані дані дозволяють виділити кілька особливостей еритроцитів щурів досліджених вікових груп. Видно, що температурна модифікація клітин підвищує їх чутливість до дії гіпертонічного стресу (стовпці 1 та 2). При цьому чутливішими до температури 49 °C є еритроцити 1-місячних щурів (рис. А та Б), пошкодження яких при дії стресового фактору зростає від 1,2 до 4 разів. Для 12-місячних тварин максимальне зростання становить 20 відсотків. Попередня інкубація у гіпертонічному розчині сахарози від 0,4 до 0,8 М призводить до значного (у 4–6 разів залежно від часу інкубації) збільшення чутливості до гіпертонічного шоку як 1-, так і 12-місячних щурів на приблизно однаковому рівні (рис. 1–3). Подальше зростання концентрації сахарози до 1 М трохи знижує чутливість клітин, що може бути пов'язане з підвищенням жорсткості мембрани. Збільшення часу інкубації в сахарозі також підвищує чутливість еритроцитів обох вікових груп до дії гіпертонічного розчину; у цьому випадку чутливішими також виявилися клітини 1-місячних тварин (рис. 1–3).

Нагрівання еритроцитів до температур вище +45 °C широко використовується для вивчення явища термічного гемолізу, функціональних якостей крові після опіків, а також як структурна модифікація клітин і їх мембран для проведення будь-якого подальшого дослідження [4, 11]. Використання модифікуючих властивостей температури ґрунтується на відомих фактах термічної денатурації протеїнів цитоскелету, зокрема спектрину і анкирину. Для еритроцитів людини температура +49 °C відповідає тепловому переходу спектрину, для щурів — анкирину [4, 13]. У роботі [13] було показано, що термоінактивційні температури для більшості мембранних білків в людських і щурячих еритроцитах дуже різні, що свід-

чить про суттєві відмінності в розташуванні їх мембранних каркасів. Але як спектрин, так і анкирин відіграють важливу роль у підтриманні зв'язку цитоскелету і мембранних протеїнів. За змінами реакції клітин з денатурованим актином на вплив стресових факторів можна судити про зрілість цитоскелет-мембранного комплексу, ступінь його формування.

Виходячи з вищесказаного та враховуючи отримані нами дані про те, що еритроцити 1-місячних тварин чутливіші до стресового впливу, можна припустити, що у молодших тварин найбільш міцною ланкою зв'язку цитоскелета і мембрани є асоціація між спектрином, анкирином та цитоплазматичною ділянкою інтегрального протеїну мембрани — протеїном смуги 3. Денатурація анкирину за температури +49 °C призводить до часткового відкріплення спектрину від мембрани і підвищує чутливість еритроцитів 1-місячних щурів до гіпертонічного стресу.

Відомо, що експонування еритроцитів у гіпертонічних неелектролітних розчинах викликає дегідратацію клітин та суттєві зміни їх іонного гомеостазу [9]. Втрати клітинами води та електролітів у таких середовищах модифікують стан протеїнів, які утворюють цитоскелет, зокрема спектрину, а також білків, які забезпечують зв'язок цитоскелету і мембрани [5, 9, 12]. У роботі [9] вказано, що саме ланка спектрин-актин-глікофорин відзначається значною чутливістю до низької іонної сили в розчинах сахарози. Початкова інкубація нативних та модифікованих еритроцитів в неелектролітних розчинах дозволяє спрогнозувати ступінь внеску цих змін в осмотичну чутливість клітин до дії гіпертонічного стресу. З огляду на те, що для нативних клітин ступінь сенсibiliзації еритроцитів щурів різного віку до гіпертонічного впливу не залежить від початкових умов тоничності в розчинах сахарози (рис. 1–3, стовпчик 1), можна припустити, що в 1-місячних щурів комплекс спектрину з актином є достатньо сформованим. Однак після температурної модифікації еритроцитів за +49 °C, яка викликає денатурацію анкирину, еритроцити 1-місячних щурів стають чутливішими (рис. 1–3, стовпчик 2), що може вказувати на наявність додаткових зв'язків між цитоскелетом та мембраною у 12-місячних щу-

рів, які з'являються як заміна частини зв'язків спектрин-анкірин-протеїн смуги 3 у процесі дорослішання організму.

Виявлені вікові особливості чутливості еритроцитів 1- та 12-місячних щурів є наслідком як вікових змін самих еритроцитів у кровоносному руслі, так і стану гемопоезу тварин 1- та 12-місячного віку. Відомо, що у процесі циркуляції еритроцитів змінюється кількісний вміст та стан протеїнів комплексу цитоскелет-плазматична мембрана, деяких мембранних фосфоліпідів [2, 3, 5, 7, 10, 16]. Крім того, у щурів перший місяць життя супроводжується постнатальним розвитком гемопоезу, формування видових особливостей якого буде завершено при досяганні статевозрілого стану організму, а саме на третій місяць життя. У цей період формується нова популяція циркулюючих еритроцитів порівняно зі станом, який є при народженні. Процес характеризується поступовим накопиченням, а згодом і повною заміною ювенільних еритроцитів на клітини, у яких морфологічні, біохімічні, функціональні характеристики відповідають видовій нормі статевозрілого стану організму [16, 17].

Сучасні дослідження показали, що гемореологічні чинники значно залежать від старіння. У більшості досліджень повідомляється про збільшення в'язкості плазми і цільної крові, збільшення агрегації еритроцитів і порушення здатності до деформації еритроцитів у старшому віці [1, 8, 17]. Повідомляється, що зміни на рівні плазматичної мембрани відіграють важливу роль у клітинному старінні. Підвищена мікров'язкість мембран зрілих тварин впливає на активність інтегральних транспортних протеїнів, відповідальних за іонний гомеостаз у клітинах [10, 16]. Проведені нами дослідження опосередковано підтверджують кореляцію транспортних процесів у мембрані і старіння організму внаслідок композиційних змін у цитоскелет-мембранному комплексі.

Висновки

Вікові особливості осмотичної чутливості еритроцитів щурів проявляються в нефізіологічних умовах як при достатньо глибо-

кій загальній модифікації клітин, так і за дії на певні компоненти їх цитоскелету.

Можна припустити, що осмотична стійкість еритроцитів щурів на ранніх етапах онтогенезу визначається станом структурно-функціонального комплексу спектрин-анкірин, а зрілі клітини відрізняються різноманітнішим комплексом зв'язків плазматична мембрана-цитоскелет, що зумовлює їх стійкість до обраних модифікацій.

Перспективи подальших досліджень.

Подальші дослідження будуть пов'язані з більш детальним вивченням зв'язків мембрана-цитоскелет у щурів різного віку та можливостями застосування знайдених особливостей щодо вивчення вікових змін еритроцитів людини.

1. Bereznyakova A. I., Jemela O. D. Deformability of the erythrocytes membrane in rats of different age in hypoxia. *Physiological journal*, 2013, vol. 59, issue 3, pp. 72–77. (in Ukrainian)

2. Filho W. J., Lima C. C., Paunksnis M. R. R., Silva A. A., Perilhão M. S., Caldeira M., Bocalini D., Souza de R. R. Reference database of hematological parameters for growing and aging rats. *The Aging Male*, 2018, vol. 21, issue 2, pp. 145–148. DOI: 10.1080/13685538.2017.1350156.

3. Giuliani A. L., Graldi G., Veronesi M., Previa-to A., Simoni M., Bergamini C., Berti G. Binding of anti-spectrin antibodies to red blood cells and vesiculation in various *in vivo* and *in vitro* ageing conditions in the rat. *Experimental Gerontology*, 2000, vol. 35, issue 8, pp. 1045–1059. DOI: 10.1016/S0531-5565(00)00173-X.

4. Ivanov I. T., Paarvanova B. K., Ivanov V., Smuda K., Bäumlner H., Georgieva R. Effects of heat and freeze on isolated erythrocyte submembrane skeletons. *General Physiology and Biophysics*, 2017, vol. 36, issue 2, pp. 155–165. DOI: 10.4149/gpb_2016046.

5. Kaneko J. J., Harvey J. W., Bruss M. L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animal*. San Diego (CA), Academic Press, 2008, 928 p. DOI: 10.1016/B978-0-12-370491-7.X0001-3.

6. Kumar D., Rizvi S. I. Markers of oxidative stress in senescent erythrocytes obtained from young and old age rats. *Rejuvenation Research*, 2014, vol. 17, issue 5, pp. 446–452. DOI: 10.1089/rej.2014.1573.

7. McCutcheon J. E., Marinelli M. Age matters. *European Journal of Neuroscience*, 2009, vol. 29, issue 5, pp. 997–1014. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2009.06648.x.

8. Mester A., Magyar Z., Molnar A., Somogyi V., Tanczos B., Peto K., Nemeth N. Age- and gender-related hemorheological alterations in intestinal ischemia-reperfusion in the rat. *Journal of Surgical Research*, 2018, vol. 225, pp. 68–75. DOI: 10.1016/j.jss.2017.12.043.

9. Moersdorf D., Egee S., Hahn C., Hanf B., Ellory C., Thomas S., Bernhardt I. Transmembrane potential of red blood cells under low ionic strength conditions. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2013, vol. 31, pp. 875–882. DOI: 10.1159/000350105.

10. Rebrova T. Y., Afanasiev S. A., Popov S. V. Age-dependent changes in Na⁺,K⁺-ATPase activity and lipid peroxidation in membranes of erythrocytes during cardiosclerosis development in rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2016, vol. 161, issue 2, pp. 235–236. DOI: 10.1007/s10517-016-3384-4.

11. Repin N. V., Bobrova E. N., Repina S. V. Thermally induced transformation of mammalian red blood cells during hyperthermia. *Bioelectrochemistry*, 2008, vol. 73, issue 2, pp. 101–105. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2008.04.017.

12. Shapkina O. A., Semionova E. A., Orlova N. V., Synchykova O. P., Shpakova N. M. Effect of glucose and partial dehydration on resistance of mammalian erythrocytes to hypertonic shock. *The Animal Biology*, 2015, vol. 17, issue 3, pp. 132–138. (in Ukrainian)

13. Shnyrov V. L., Orlov S. N., Zhadan G. G., Pokudin N. I. Thermal inactivation of membrane proteins, volume-dependent Na⁺, K⁺-cotransport, and pro-

tein kinase C activator-induced changes of the shape of human and rat erythrocytes. *Biomedica biochimica acta*, 1990, vol. 49, issue 6, pp. 445–453.

14. Shpakova N. M., Orlova N. V., Iershov S. S., Iershova N. A., Aleksandrova D. I. Temperature and osmolarity as factors determining resistance of mammalian erythrocytes to hypertonic shock. *Bulletin of problems biology and medicine*, 2015, vol. 3, issue 1, pp. 242–246. (in Russian)

15. Shpakova N. M., Orlova N. V., Nipot E. E., Shapkina O. A., Mazur A. A. Osmotic sensitivity of mammalian erythrocytes under their initial state modification. *Bulletin of problems biology and medicine*, 2016, vol. 3, issue 2, pp. 356–361. (in Russian)

16. Singh S., Pandey K. B., Rizvi S. I. Erythrocyte senescence and membrane transporters in young and old rats. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 2016, vol. 122, issue 4, pp. 228–234. DOI: 10.1080/13813455.2016.1190761.

17. Somogyi V., Peto K., Deak A., Tanczos B., Nemeth N. Effects of aging and gender on micro-rheology of blood in 3 to 18 months old male and female *Wistar* (CrI:WI) rats. *Biorheology*, 2018, vol. 54, issue 5–6, pp. 127–140. DOI: 10.3233/BIR-17148.