

УДК 591.111.1.086.142:547.455.623:57.043

ВПЛИВ ГЛЮКОЗИ І ЧАСТКОВОГО ЗНЕВОДНЕННЯ НА СТІЙКІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ ССАВЦІВ ДО ГІПЕРТОНІЧНОГО ШОКУ

О. О. Шапкина, К. А. Семіонова, Н. В. Орлова, О. П. Синчикова, Н. М. Шпакова
starling.nataly@gmail.com

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,
вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61015, Україна

Робота присвячена дослідженню стійкості еритроцитів людини, кролика і щура до дії гіпертонічного шоку при зміні початкового стану клітин, який модифікували за допомогою глюкози і 0,4 моль/л NaCl. Рівень гемолізу еритроцитів ссавців, які піддавали дії гіпертонічного шоку (перенесення клітин в 4,0 моль/л NaCl), реєстрували спектрофотометрично.

Показано, що максимальний рівень ушкодження в 4,0 моль/л NaCl спостерігається для еритроцитів людини, мінімальний — для клітин кролика, що може бути зумовлено особливостями їх плазматичних мембран. Попереднє інкубування еритроцитів у 0,4 моль/л NaCl призводить до формування стабільного стану клітин людини і кролика, про що свідчить зниження їх чутливості до 4,0 моль/л NaCl. Чутливість зневоднених еритроцитів щура до гіпертонічного шоку не змінюється. Обробка клітин глюкозою в концентрації 0,6% не впливає на рівень гіпертонічного гемолізу еритроцитів ссавців, що досліджувались. Глюкоза у високій концентрації (5%) призводить до підвищення рівня гемолізу еритроцитів людини в умовах гіпертонічного шоку і не впливає на гіпертонічне пошкодження еритроцитів тварин. Це пов'язано з різним вмістом глюкози в крові ссавців в нормі і можливістю утворення глікозильованих форм білків і фосфоліпідів під дією глюкози.

При зміні початкового стану клітин у результаті комбінованої дії глюкози і 0,4 моль/л NaCl виявлена різна реакція еритроцитів ссавців на гіпертонічний шок. Якщо для еритроцитів щура спостерігається підвищення стійкості до гіпертонічного шоку, то для клітин людини і кролика не виявлено зміни рівня гіпертонічного гемолізу. Це свідчить про те, що захисний ефект глюкози проявляється в тому випадку, коли клітини ссавців не досягають стабільного стану в результаті їх часткового зневоднення.

Ключові слова: ЕРИТРОЦИТИ ССАВЦІВ, ГЛЮКОЗА, ЗНЕВОДНЕННЯ КЛІТИН, ГІПЕРТОНІЧНИЙ ШОК, ТЕМПЕРАТУРА

EFFECT OF GLUCOSE AND PARTIAL DEHYDRATION ON RESISTANCE OF MAMMALIAN ERYTHROCYTES TO HYPERTONIC SHOCK

O. A. Shapkina, E. A. Semionova, N. V. Orlova, O. P. Synchykova, N. M. Shpakova
starling.nataly@gmail.com

Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences
of Ukraine, 23, Pereyaslovskaya str., Kharkov, Ukraine 61015

The paper is devoted to the studying the resistance of human, rabbit and rat erythrocytes to the effect of hypertonic shock when changing an initial status of cells modified with glucose and 0.4 mol/l NaCl. The hemolysis level of mammalian erythrocytes subjected to hypertonic shock (transfer of cells into and 4.0 mol/l NaCl) was spectrophotometrically recorded.

It has been shown that maximal level of injury in 4.0 mol/l NaCl is observed for human erythrocytes and minimal one is done for the cells of rabbit that may be stipulated with peculiarities of their plasmatic membranes. Pre-incubation of erythrocytes in 0.4 mol/l NaCl leads to the formation of stable state of human rabbit cells that is confirmed with the reduction of their sensitivity to 4.0 mol/l NaCl. Sensitivity of dehydrated rat's erythrocytes to hypertonic shock did no change. Treatment of cells with glucose in the concentration of 0.6% does not affect the level of hypertonic hemolysis of erythrocytes of the studied mammals. Glucose in high concentration (5%) results in the rise of hypertonic hemolysis of human erythrocytes and dose not alter the injury level of animals' cells. This is related to various content of glucose in mammalian blood in the norm and possible formation of glycosylated forms of proteins and phospholipids.

When changing an initial state of cells as a result of combined effect of glucose and 0.4 mol/l NaCl there was revealed different response of mammalian erythrocytes to hypertonic shock. If for rat's erythrocytes there was found an increase in the resistance to hypetonic shock then for human and rabbit cells there was not found a change in hypertonic hemolysis level. This testifies to the fact that protective effect of glucose is manifested in the case when the mammalian cells do not achieve the stable state because of their partial dehydration.

Key words: MAMMALIAN ERYTHROCYTES, GLUCOSE, CELL DEHYDRATION, HYPERTONIC SHOCK, TEMPERATURE

ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОЗЫ И ЧАСТИЧНОГО ОБЕЗВОЖИВАНИЯ НА УСТОЙЧИВОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ К ГИПЕРТОНИЧЕСКОМУ ШОКУ

О. А. Шапкина, Е. А. Семионова, Н. В. Орлова, О. П. Сынчикова, Н. М. Шпакова
starling.nataly@gmail.com

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г.Харьков)
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, 61015, Украина

Работа посвящена исследованию устойчивости эритроцитов человека, кролика и крысы к действию гипертонического шока при изменении начального состояния клеток, которое модифицировали с помощью глюкозы и 0,4 моль/л NaCl. Уровень гемолиза эритроцитов млекопитающих, подвергнутых действию гипертонического шока (перенесение клеток в 4.0 моль/л NaCl), регистрировали спектрофотометрически.

Показано, что максимальный уровень повреждения в 4.0 моль/л NaCl наблюдается для эритроцитов человека, минимальный — для клеток кролика, что может быть обусловлено особенностями их плазматических мембран. Предварительное инкубирование эритроцитов в 0,4 моль/л NaCl приводит к формированию стабильного состояния клеток человека и кролика, о чем свидетельствует снижение их чувствительности к 4,0 моль/л NaCl. Чувствительность обезвоженных эритроцитов крысы к гипертоническому шоку не изменяется. Обработка клеток глюкозой в концентрации 0,6% не влияет на уровень гипертонического гемолиза эритроцитов исследованных млекопитающих. Глюкоза в высокой концентрации (5%) приводит к повышению гипертонического гемолиза эритроцитов человека и не изменяет уровень повреждения клеток животных. Это связано с разным содержанием глюкозы в крови млекопитающих в норме и возможностью образования гликозилированных форм белков и фосфолипидов.

При изменении начального состояния клеток в результате комбинированного действия глюкозы и 0,4 моль/л NaCl выявлена различная реакция эритроцитов млекопитающих на гипертонический шок. Если для эритроцитов крысы наблюдается повышение устойчивости к гипертоническому шоку, то для клеток человека и кролика не выявлено изменения уровня гипертонического гемолиза. Это свидетельствует о том, что защитный эффект глюкозы проявляется в том случае, когда клетки млекопитающих не достигают стабильного состояния в результате их частичного обезвоживания.

Ключевые слова: ЭРИТРОЦИТЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ, ГЛЮКОЗА, ОБЕЗВОЖИВАНИЕ КЛЕТОК, ГИПЕРТОНИЧЕСКИЙ ШОК, TEMPERATURE

Рішення проблеми переливання крові пов'язано безпосередньо із підтриманням структурно-функціональних властивостей еритроцитів, що багато в чому залежать від середовищ, які використовують при тривалому зберіганні. Основний шлях вироблення енергії в еритроцитах — гліколіз, який пов'язаний із утилізацією глюкози та утворенням АТФ [1, 2]. Глюкоза є важливою речовиною енергетичного життєзабезпечен-

ня еритроцитів. Тому для підтримки життєздатності клітин при тривалому зберіганні необхідно вводити до позаклітинного середовища глюкозу з метою достатнього внутрішньоклітинного утворення основного макроерга — АТФ.

Довгострокове зберігання еритрома-си з метою подальшого переливання крові забезпечується в умовах низькотемпературної консервації. При заморожуванні на біо-

логічний об'єкт діє цілий ряд несприятливих факторів, для вивчення яких використовують модельні експерименти [3]. Зокрема, гіпертонічний шок застосовують для вивчення впливу на еритроцити високих концентрацій солей, які утворюються при виморожуванні води в умовах низькотемпературної консервації [3]. Для успішного зберігання еритроцитів важливим є стан клітин перед заморожуванням, який багато в чому залежить від складу і температури середовища.

У низці робіт показана різна реакція еритроцитів ссавців, які характеризуються певними особливостями цитоплазми і цитоскелет-мембранного комплексу [4–8], на зміну температурно-осмотичних умов середовища [3]. Крім того, певні фактори зовнішнього середовища можуть модулювати чутливість еритроцитів до дії стресу. Так, часткове зневоднення еритроцитів людини підвищує їх стійкість до подальшої дії гіпертонічного шоку [9]. Становило інтерес в порівняльному аспекті оцінити реакцію еритроцитів різних видів ссавців на дію гіпертонічного шоку при варіюванні складу позаклітинного середовища.

Мета роботи — провести порівняльне вивчення стійкості еритроцитів людини, кролика і щура до гіпертонічного шоку (4,0 моль/л NaCl) при зміні початкового стану клітин під дією глюкози і 0,4 моль/л NaCl.

Матеріали і методи

Для дослідження використовували еритроцити, отримані з крові людини, щура і кролика, що була заготовлена на консерванті «Глюгіцир». Експерименти було проведено відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених V Національним конгресом із біоетики (Київ, 2013) і погоджених із положеннями «Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985). Виділення еритроцитів проводили за стандартною методикою [10].

Еритроцити зберігали у вигляді щільного осаду не більше двох годин при

температурі 0°C. Усі середовища, які використовували в роботі, готували на 0,01 моль/л фосфатному буфері, pH 7,4. Вихідну суспензію еритроцитів готували перенесенням 500 мкл осаду еритроцитів у 5 мл фізіологічного розчину.

Гіпертонічний шок еритроцитів ссавців (ГШ) проводили шляхом внесення 50 мкл вихідної суспензії клітин у 1,0 мл розчину, який містив 4,0 моль/л NaCl, при температурі 0°C із подальшою інкубацією протягом 5 хв. Кінцевий гематокрит становив 0,4%. При вивченні впливу попереднього зневоднення еритроцитів на їх стійкість до ГШ, 50 мкл клітинного осаду вносили в 0,5 мл розчину NaCl (0,4 моль/л) при температурі 0°C на 2 хв, після чого клітини піддавали дії ГШ.

Кількість гемоглобіну, що вивільнився в супернатант, визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 543 нм. За 100 % приймали поглинання проби, у яку додавали детергент тритон X-100 в концентрації 0,1 %.

Обробку глюкозою еритроцитів ссавців здійснювали методом інкубації клітин (гематокрит 20%) у фізіологічному розчині, який містив 0,6 або 5% глюкози, при температурі 37°C протягом 2 годин. Контролем служили клітини, які були проінкубовані в аналогічних умовах у фізіологічному розчині, який не містив глюкозу. По завершенню часу інкубації залишки глюкози видаляли із середовища центрифугуванням клітинної суспензії при 1500 об/хв протягом 7 хв. Потім ці клітини піддавали дії ГШ (4,0 моль/л NaCl) або спочатку інкубували в 0,4 моль/л NaCl, а потім переносили у 4,0 моль/л NaCl (температура 0°C).

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

Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою програми «Statistica» (версія 6.0). Експериментальні дані подані як медіана, інтерквартильний інтервал (Q1-Q3) і максимальне та мінімальне значення. Для перевірки статистичної значущості відмінностей досліджуваних числових показників використовували кри-

терії Манна-Уїтні. Відмінності між групами вважали статистично значущими при $P < 0,05$.

Результати й обговорення

Еритроцити ссавців при перенесенні в середовище, яке містить 4,0 моль/л NaCl, при 0°C гемолізують (рис. 1). Максимальний рівень ушкодження спостерігається для еритроцитів людини, мінімальний — для клітин кролика. Мембрана еритроцитів кролика позбавлена глікофору А [11], що знижує ступінь її контакту з внутрішньоклітинними молекулами гемоглобіну [12]. В результаті цього зменшується ймовірність утворення трансмембранних дефектів в умовах дії стресових факторів, що й обумовлює високу стійкість еритроцитів кролика до ГШ.

Деякі екзогенні фактори середовища сприяють формуванню стабільного стану еритроцитів людини до подальшої дії ГШ. Зокрема, певні концентрація солі і значення температури розчину, в якому еритроцити інкубуються, дозволяють варіювати їх чутливість до ГШ [13]. Так, еритроцити людини після інкубування в 0,4 моль/л NaCl проявляють максимальну стійкість до перенесення в 4,0 моль/л NaCl (температура 0°C). Виходячи з того, що в зазначених умовах спостерігається максимально виражене зниження рівня гіпертонічного гемолізу еритроцитів людини, аналогічні температурно-осмотичні умови експерименту були обрані і для еритроцитів щура і кролика. Клітини ссавців інкубували в 0,4 моль/л NaCl, після чого їх піддавали дії ГШ (4,0 моль/л NaCl).

З даних, поданих на Рис. 1, видно, що рівень гіпертонічного гемолізу зневоднених еритроцитів людини і кролика знижується в 9 і 4 рази в порівнянні з відповідними контрольними клітинами. Попереднє інкубування клітин щура в 0,4 моль/л NaCl не впливає на їх чутливість до ГШ, на відміну від еритроцитів людини і кролика (Рис. 1). Для клітин щура характерне максимальне зниження гіпертонічного гемолізу після інкубування клітин у середовищі з нижчою концентрацією NaCl (0,3 моль/л) [14].

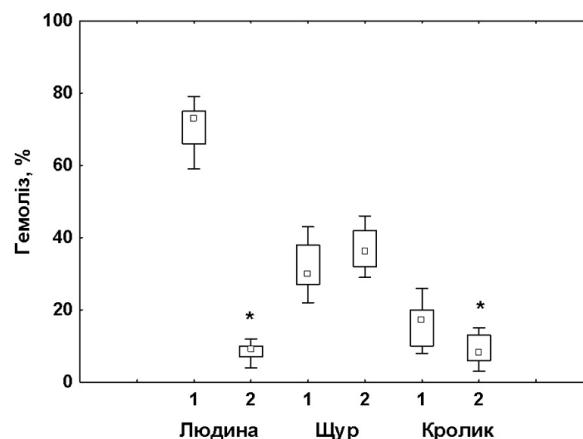


Рис. 1. Рівень гемолізу еритроцитів ссавців, перенесених в 4,0 моль/л NaCl із середовищ, що містять 0,15 (1) і 0,4 моль/л NaCl (2); тут і далі: □ — медіана, □ — інтерквартильний інтервал (Q1–Q3), I — максимальне-мінімальне значення (* — статистично значущі відмінності у порівнянні з контролем (1) ($P < 0,05$), кількість спостережень у кожній групі — 7)

Оскільки еритроцити ссавців позбавлені мітохондрій, то ці клітини в якості енергетичного матеріалу використовують переважно глюкозу [1, 2]. В еритроцитах катаболізм глюкози забезпечує збереження структури і функції гемоглобіну, цілісність мембран та утворення енергії для роботи іонних насосів. Глюкоза надходить в еритроцити шляхом полегшеної дифузії за допомогою спеціальних переносників [15, 16.]. Близько 90 % глюкози, яка надходить, використовується в анаеробному гліколізі, а інші 10 % — у пентозофосфатному шляху [1]. Глюкоза входить до складу гемоконсерванту, призначеного для забору та зберігання крові, що дозволяє підтримувати протягом певного часу структурно-функціональні властивості еритроцитів.

Становило інтерес дослідити вплив глюкози на стійкість еритроцитів ссавців до зміни температурно-осмотичних умов середовища. Для вивчення впливу глюкози на стійкість клітин до дії ГШ були обрані концентрації 0,6 % і 5 %. Отримані дані подано на рис. 2–4.

З Рис. 2а видно, що попередня інкубація еритроцитів людини у розчині глюкози з концентрацією 0,6 % не впливає на рівень гіпертонічного гемолізу. Збільшення

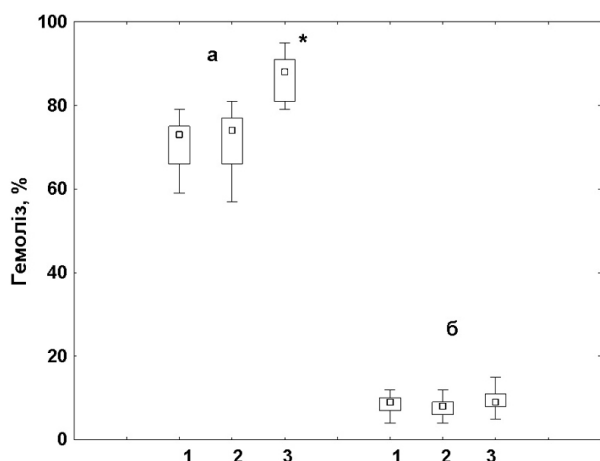


Рис. 2. Вплив глюкози на рівень гемолізу еритроцитів людини, перенесених в 4,0 моль/л NaCl із середовищ, що містять 0,15 (а) і 0,4 моль/л NaCl (б): 1 — контроль; 2 — 0,6 % глюкоза; 3 — 5 % глюкоза

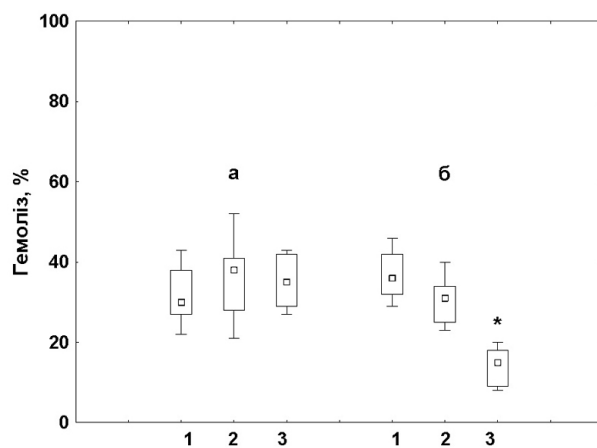


Рис. 3. Вплив глюкози на рівень гемолізу еритроцитів щура, перенесених в 4,0 моль/л NaCl з середовищ, що містять 0,15 (а) і 0,4 моль/л NaCl (б): 1 — контроль; 2 — 0,6 % глюкоза; 3 — 5 % глюкоза

концентрації глюкози до 5%. спричиняє статистично значуще підвищення гемолітичного пошкодження клітин в умовах ГШ, що може бути обумовлено зменшенням текучості еритроцитарної мембрани під дією глюкози [17, 18].

При перенесенні еритроцитів людини з середовища, що містить 0,4 моль/л NaCl, в 4,0 моль/л NaCl не спостерігається зміни рівня гіпертонічного гемолізу клітин, оброблених глюкозою в обох концентраціях (0,6 і 5%) (Рис. 2б).

Інкубування еритроцитів щура з глюкозою в концентрації 0,6% призводить до незначного збільшення гіпертонічного гемолізу, проте воно не є статистично значущим (рис. 3а). При використанні глюкози у вищій концентрації (5%) зміни рівня гемолізу клітин в 4,0 моль/л NaCl не виявлено (рис. 3а).

Для зневоднених еритроцитів щура (в 0,4 моль/л NaCl) спостерігається дворазове зниження гіпертонічного гемолізу при використанні глюкози у високій концентрації (Рис. 3б).

Слід зазначити, що для еритроцитів кролика спостерігається низький рівень гемолітичного пошкодження у середовищі, яке містить 4,0 моль/л NaCl, що не залежить від застосування глюкози в будь-якій з використаних концентрацій (рис. 4а).

У разі зневоднення клітин кролика в 0,4 моль/л NaCl використання глюкози не

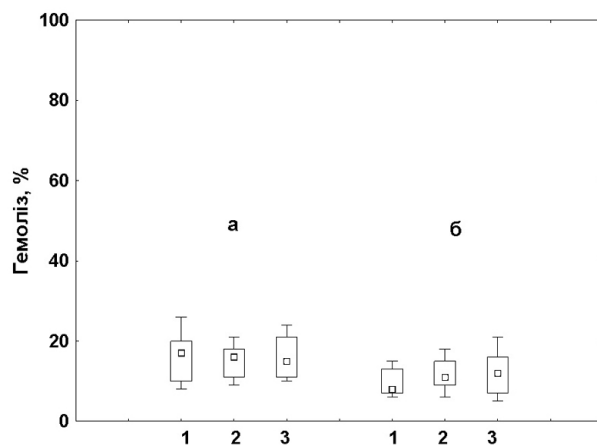


Рис. 4. Вплив глюкози на рівень гемолізу еритроцитів кролика, перенесених в 4,0 моль/л NaCl з середовищ, що містять 0,15 (а) і 0,4 моль/л NaCl (б): 1 — контроль; 2 — 0,6% глюкоза; 3 — 5 % глюкоза

приводить до статистично значущої зміни рівня гіпертонічного гемолізу (рис. 4б).

Отримані дані свідчать, що зневоднення еритроцитів людини і кролика у середовищі, яке містить 0,4 моль/л NaCl, призводить до формування стабільного стану клітин по відношенню до подальшої дії ГШ, що власне проявляється у зниженні рівня гіпертонічного гемолізу (рис. 1). У разі еритроцитів щура, проінкубованих в 0,4 моль/л NaCl, зниження гіпертонічного гемолізу не виявлено. Серед зневоднених еритроцитів ссавців (людини, кролика і щур) захисний ефект глюкози (5%) в умовах ГШ показаний тільки для клітин щура. Таким чином, можна вважати, що ефект глюкози

проявляється в тому випадку, коли клітини не досягають стабільного стану в результаті їх часткового зневоднення.

Висока чутливість еритроцитів людини до 5% глюкози, що тестується за допомогою ГШ, мабуть, пов'язана з тим, що швидкість транспорту глюкози в еритроцити людини вища за клітини щура і кролика [16, 19]. Крім того, нормальний вміст глюкози в крові людини нижчий у порівнянні із кров'ю тварин (щур, кролик). Так, вміст глюкози в крові людини коливається в межах 3,3–5,5 ммоль/л, у той час як для крові щура характерний діапазон становить 4–10 ммоль/л, а для крові кролика — 6–16 ммоль/л [20, 21].

Споживання глюкози клітинами відбувається шляхом полегшеної дифузії. Отже, швидкість трансмембранного потоку глюкози залежить тільки від градієнта її концентрації. Високий вміст глюкози у позаклітинному середовищі сприяє її надходженню всередину клітини. Підвищений внутрішньоклітинний вміст глюкози призводить до її неферментативного з'єднання з молекулами гемоглобіну, тобто утворення глікозилизованого гемоглобіну [22]. Крім того, показано неферментативне глікозилювання білків і ліпідів цитоскелет-мембранного комплексу еритроцитів [23, 24].

Збільшення гіпертонічного гемолізу еритроцитів людини, які інкубувалися з глюкозою у високій концентрації (Рис. 2а), можливо, обумовлене порушенням стану еритроцитарної мембрани внаслідок розвитку неферментативного глікозилювання компонентів цитоскелет-мембранного комплексу клітини. Подібного збільшення чутливості до ГШ для еритроцитів тварин під дією глюкози не виявлено. Мабуть, це пов'язано з різною пороговою внутрішньоклітинною концентрацією глюкози в еритроцитах ссавців, при якій починає розвиватися ковалентна модифікація компонентів мембрани і внутрішньоклітинного вмісту.

Висновки

1. Попереднє інкубування еритроцитів людини і кролика в 0,4 моль/л NaCl при-

зводить до підвищення їх стійкості до дії ГШ і не впливає на стійкість зневоднених клітин щура.

2. Глюкоза у концентрації 0,6 % не впливає на рівень гіпертонічного гемолізу еритроцитів людини, щура і кролика. Глюкоза у високій концентрації (5 %) підвищує пошкодження еритроцитів людини в умовах ГШ і не впливає на гіпертонічну чутливість еритроцитів тварин.

3. Показано, що наявність додаткового фактора впливу на клітини — їхнє зневоднення в 0,4 моль/л NaCl, — виявляє різну реакцію на ГШ еритроцитів ссавців, які оброблені глюкозою в концентрації 5 %: рівень гіпертонічного гемолізу еритроцитів щура знижується, а клітин кролика і людини не змінюється.

Перспективи подальших досліджень.

Дослідити стійкість еритроцитів ссавців до дії різних стресових факторів (механічний шок, гіпотонічний лізис, гіпертонічний кріогемолізу) при зміні початкового стану клітин під дією глюкози і 0,4 моль/л NaCl.

1. Severin Ye. S., ed. Biochemistry. Moscow, Geotar-Med., 2003, 779 p. (In Russian).

2. Vasilyeva Ye. M. Biochemical features of the erythrocyte. Effect pathology. *Biomedical Chemistry*, 2005, vol. 51, no. 2, pp. 118–126. (In Russian).

3. Shpakova N. M. Osmotic and temperature stress erythrocytes of various species of mammals. *The Animal Biology*, 2010, vol. 12, no. 1, pp. 382–391. (In Ukrainian).

4. Florin-Christensen J., Suarez C. E., Florin-Christensen M., Wainszelbaum M., Brown W. C., McElwain T. F., Palmer G. H. A unique phospholipid organization in bovine erythrocyte membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98, (14), pp. 7736–7741.

5. Benga G. Comparative studies of water permeability of red blood cells from humans and over 30 animal species: an overview of 20 years of collaboration with Philip Kuchel. *Eur. Biophys. J.*, 2013, 42, (1), pp. 33–46.

6. Liu L., Lei T., Bankir L., Zhao D., Gai X., Zhao X., Yang B. Erythrocyte permeability to urea and water: comparative study in rodents, ruminants, carnivores, humans, and birds. *J. Comp. Physiol. B.*, 2011, 181, (1), pp. 65–72.

7. Matei H., Frentescu L., Benga Gh. Comparative studies of the protein composition of red blood cell membranes from eight mammalian species. *J. Cell. Mol. Med.*, 2000, 4, (4), pp. 270–276.
8. Bogner P., Sipos K., Ludány A., Somogyi B., Miseta A. Steady-state volumes and metabolism-independent osmotic adaptation in mammalian erythrocytes *Eur. Biophys. J.*, 2002, 31, (2), pp. 145–152.
9. Aleksandrova D. I., Orlova N. V., Shpakova N. M. Comparative study of preliminarily dehydrated human and bovine erythrocyte sensitivity to hypertonic stress. *Problems of Cryobiology*, 2007, 17, (4), pp. 327–334.
10. Shpakova N. M., Ershov S. S., Orlova N. V. Hypertonic cryohemolysis in bovine, equine, canine and human erythrocytes: osmotic and temperature peculiarities. *The Animal Biology*, 2011, vol.13, no. 1–2, pp. 320–328.
11. Ligi F., Ciacci C., Palma F., Palma F. Comparative study of the cytoplasmic domain of band 3 from human and rabbit erythrocyte membranes. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 1998, 121, (3), pp. 265–271.
12. Rauenbuehler P. B., Cordes K. A., Salhany J. M. Identification of the haemoglobin binding sites on the inner surface of the erythrocyte membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 1982, 692, (3), pp. 361–370.
13. Shpakova N. M., Pantaler E. R., Bondarenko V. A. Antihemolytic effect of chlorpromazine on erythrocytes in hyperosmotic and cold shock. *Biochemistry*, 1995, vol. 60, no. 10, pp. 1624–1631. (In Russian).
14. Shpakova N. M. Temperature and osmotic resistance of erythrocytes of different mammalian species. Dr. biological sci. diss. Kharkov, 2014, 392 p. (In Russian).
15. Montel-Hagen A., Blanc L., Boyer-Clavel M., Jacquet C., Vidal M. The Glut1 and Glut4 glucose transporters are differentially expressed during perinatal and postnatal erythropoiesis. *Blood*, 2008, 112, (12), pp. 4729–4738.
16. Wagner R., Zimmer G., Lacko L. An interspecies approach to the investigation of the red cell membrane glucose transporter. *Biochim Biophys Acta*, 1984, 771, (1), pp. 99–102.
17. Przybylska M., Bryszewska M., Chapman I. Thermal properties and fluidity of human erythrocyte membranes in diabetes mellitus. *Int J Radiat Biol.*, 1993, 63, (3), pp. 419–424.
18. Waczulíková I., Sikurová L., Cársky J. Fluidity gradient of erythrocyte membranes in diabetics: the effect of resorcyldene aminoguanidine. *Bioelectrochemistry*, 2002, 55, (1-2), pp. 53–55.
19. Albert S. G. Cytochalasin B does not serve as a marker of glucose transport in rabbit erythrocytes. *Biochem Int.*, 1984, 9, (1), pp. 93–103.
20. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes — 2014. *Diabetes Care*, 2014, 37, (Suppl. 1), pp. S14–S80. doi: 10.2337/dc14-S014.
21. Ewringmann A. *Leitsymptome beim Kaninchen: Diagnostischer Leitfaden und Therapie* [Keynotes in rabbits: A diagnostic and treatment guidelines]. Verlag, Enke, 2010. 344 p. (In German)
22. Watała C. In vitro glycation of red blood cell proteins: high levels of glucose lower lipid fluidity of erythrocyte membranes. *Exp Pathol.*, 1988, 33, (4), pp. 233–238.
23. Birlouez-Aragon I., Scalbert-Menanteau P., Morawiec M., Shafieezadeh M. Evidence for a relationship between protein glycation and red blood cell membrane fluidity. *Biochem Biophys Res Commun.*, 1990, 170, (3), pp. 1107–1113.
24. Bucala R., Makita Z., Koschinsky T., Cerami A., Vlassara H. Lipid advanced glycosylation: Pathway for lipid oxidation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, (14), pp. 6434–6438.