

УДК: 541.183:57.043:577.352.4:611.018.51

АМФІФІЛИ ЯК ІНСТРУМЕНТ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ ГІПЕРТОНІЧНОГО КРІОГЕМОЛІЗУ ЕРИТРОЦИТІВ ССАВЦІВ

Н. А. Єршова, Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова, С. С. Єршов
starling_nataly@meta.ua

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

Робота присвячена дослідженню впливу представників різних класів амфифільних сполук на гіпертонічний кріогемоліз еритроцитів різних видів ссавців.

У порівняльному аспекті вивчена чутливість еритроцитів людини, коня, бика і кролика до охолодження у гіпертонічних середовищах. Показано, що для еритроцитів людини і коня залежності гіпертонічного кріогемолізу характеризуються немонотонністю, що проявляється в наявності певного максимуму (для людини — 1,2; коня — 1,4–1,6 моль/л NaCl) з подальшим зниженням рівня пошкодження. Для еритроцитів бика і кролика рівень ушкодження збільшується зі зростанням концентрації солі в середовищі у всьому концентраційному діапазоні, що досліджувався (до 2,2 моль/л NaCl).

Використання амфифільних сполук дозволило встановити їх ефективність в умовах гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів ссавців. Показано, що катіонний трифторперазин, аніонний децилсульфат натрію і неіонний додецил- β ,D-мальтозид підвищують стійкість еритроцитів ссавців до гіпертонічного кріогемолізу в середовищах, що містять 1,2 і 2,1 моль/л NaCl. Однак в останньому випадку ефективність усіх досліджуваних амфифільних сполук зменшується, що проявляється в зниженні величин антигемолітичної активності й значень ефективних концентрацій. Це дозволяє говорити про приховані пошкодження, які накопичуються в мембрані при збільшенні сили стресового чинника. Отже, зниження рівня гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів людини і коня в 2,1 моль/л NaCl, яке реєструється в відсутності амфифільних речовин, не є відображенням поліпшення стану мембрани. При цьому збільшення внутрішньоклітинного вмісту катіонів натрію в еритроцитах людини в висококонцентрованих сольових середовищах свідчить про порушення бар'єрних властивостей еритроцитарних мембран.

Ключові слова: ЕРИТРОЦИТИ ССАВЦІВ, ГІПЕРТОНІЧНИЙ КРІОГЕМОЛІЗ, ДЕЦИЛСУЛЬФАТ НАТРІЮ, ДОДЕЦИЛ- β ,D-МАЛЬТОЗИД, ТРИФТОРПЕРАЗИН, АНТИГЕМОЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ, ЕФЕКТИВНІ КОНЦЕНТРАЦІЇ

AMPHIPHILES AS TOOLS FOR STUDYING HYPERTONIC CRYOHEMOLYSIS OF MAMMALIAN ERYTHROCYTES

N. A. Ershova, N. M. Shpakova, N. V. Orlova, S. S. Ershov
starling_nataly@meta.ua

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Pereyaslavska st., 23, Kharkov, 61015, Ukraine

The paper is devoted to the studying of effect caused by representatives of some amphiphilic compounds on hypertonic cryohemolysis of erythrocytes of various mammalian species.

There was comparatively studied sensitivity of human, equine, bovine and rabbit erythrocytes to the cooling in hypertonic media. It was shown that dependencies of hypertonic cryohemolysis for human and equine erythrocytes are characterized by unmonotonous manifesting in the presence of certain maximum (for human it is 1.2, for horse this is 1.4–1.6 mol/l of NaCl) with the following reduction of damage degree. Damage degree of bovine and rabbit erythrocytes decreases with saline concentration growth in the medium within all the studied concentration range (up to 2.2 mol/l of NaCl).

The using of amphiphilic compounds enabled to establish their efficiency under hypertonic cryohemolysis of mammalian erythrocytes. It was shown that cationic trifluoperazine, anionic sodium decyl sulfate and nonionic dodecyl- β ,D-maltoside decrease the resistance of mammalian erythrocytes to hypertonic hemolysis in 1.2 and 2.1 mol/l of NaCl. However in the latter case efficiency of all the studied amphiphilic compounds decreases manifesting in reduction of antihemolytic activity and the values of effective concentrations of substances. It reveals the invisible damages accumulating in membrane when increasing power of stress factor. Therefore reduction of hypertonic cryohemolysis level of human and equine erythrocytes in 2.1 mol/l of NaCl found with no amphiphilic properties is not real evidence of membrane state improvement. Herewith the revealed increasing of intracellular content of sodium cations of human erythrocytes in high-concentrated salines testifies to disordered barrier properties of erythrocyte membranes.

Keywords: MAMMALIAN ERYTHROCYTES, HYPERTONIC CRYOHEMOLYSIS, SODIUM DECYL SULFATE, DODECYL- β ,D-MALTOSE, TRIFLUOPERAZINE, ANTIHEMOLYTIC ACTIVITY, EFFECTIVE CONCENTRATIONS

АМФИФИЛЫ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ГИПЕРТОНИЧЕСКОГО КРИОГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Н. А. Ершова, Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова, С. С. Ершов
starling_nataly@meta.ua

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

Работа посвящена исследованию влияния представителей разных классов амфифильных соединений на гипертонический криогемолиз эритроцитов разных видов млекопитающих.

В сравнительном аспекте изучена чувствительность эритроцитов человека, лошади, быка и кролика к охлаждению в гипертонических средах. Показано, что для клеток человека и лошади зависимости гипертонического криогемолиза характеризуются немонотонностью, что проявляется в наличии определенного максимума (для человека — 1,2, лошади — 1,4–1,6 моль/л NaCl) с последующим снижением уровня повреждения. Для эритроцитов быка и кролика уровень повреждения увеличивается с ростом концентрации соли в среде во всем исследуемом концентрационном диапазоне (до 2,2 моль/л NaCl).

Использование амфифильных соединений позволило установить их эффективность в условиях гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих. Показано, что катионный трифторперазин, анионный децилсульфат натрия и неионный додецил- β ,D-мальтозид повышают устойчивость эритроцитов млекопитающих к гипертоническому криогемолизу в средах, содержащих 1,2 или 2,1 моль/л NaCl. Однако в последнем случае эффективность всех исследуемых амфифильных соединений уменьшается, что проявляет в снижении величин антигемолитической активности и значений эффективных концентраций веществ. Это позволяет говорить про скрытые повреждения, которые накапливаются в мембране при увеличении силы стрессового фактора. Следовательно, снижение уровня гипертонического криогемолиза эритроцитов человека и лошади в 2,1 моль/л NaCl, которое регистрируется в отсутствие амфифильных веществ, не является отображением улучшения состояния мембраны. При этом установленное увеличение внутриклеточного содержания катионов натрия в эритроцитах человека в высококонцентрированных солевых средах свидетельствует о нарушении барьерных свойств эритроцитарных мембран.

Ключевые слова: ЭРИТРОЦИТЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ, ГИПЕРТОНИЧЕСКИЙ КРИОГЕМОЛИЗ, ДЕЦИЛСУЛЬФАТ НАТРИЯ, ДОДЕЦИЛ- β ,D-МАЛЬТОЗИД, ТРИФТОРПЕРАЗИН, АНТИГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ, ЭФФЕКТИВНЫЕ КОНЦЕНТРАЦИИ

Холодовий шок широко використовують для моделювання ситуації, яка виникає при низькотемпературній консервації клітин [1]. Зазвичай, під холодним шоком розуміють пошкодження клітин при їх швидкому охолодженні в зоні позитивних температур. Пошкодження еритроцитів ссавців при охолодженні до 0 °С спостерігається тільки в гіпертонічних середовищах. Для того, щоб підкреслити особливості розвитку холодного пошкодження еритроцитів, відносно до цих клітин використовують термін «гіпертонічний криогемоліз» (ГК).

Раніше було показано, що амфифільні сполуки здатні знижувати рівень гіпертонічного криогемолізу еритроцитів людини [2, 3]. Захисну дію цих сполук пов'язують з їх здатністю вбудовуватися в мембрану і модифікувати її [4]. Таким чином, антигемолітична активність амфифільних сполук може визначатися, з одного боку, їх фізико-хімічними властивостями, з іншого — складом і станом еритроцитарних мембран. У зв'язку з цим становило інтерес дослідження ефективність амфифільних сполук, що відносяться до різних класів поверхнево-активних речовин, в умовах гіпертонічного криогемолізу еритроцитів різних видів ссавців, які, в значній мірі, різняться складом цитоскелет-мембранного комплексу [5, 6].

Мета роботи — провести порівняльне вивчення впливу представників катіонних (трифторперазин), аніонних (децилсульфат натрію) і неіонних (додецил-β, D-мальтозид) амфифільних сполук на гіпертонічний криогемоліз еритроцитів людини, бика, коня і кролика.

Матеріали і методи

Для дослідження використовували еритроцити, отримані з крові людини (*Homo sapiens*), бика (*Bos taurus*), коня (*Equus caballus*) і кролика (*Oryctolagus cuniculus*), що була заготовлена на консерванті «Глюгіцир». Виділення

еритроцитів проводили за стандартною методикою [2, 3].

Гіпертонічний криогемоліз еритроцитів проводили шляхом внесення еритроцитів у гіпертонічний розчин NaCl при температурі 37 °С на 10 хв з подальшим перенесенням аліквоти в розчин тієї ж тоничності, охолоджений до 0 °С на 10 хв. Кінцевий гематокрит становив 0,4 %. Амфифільні сполуки в ефективній концентрації додавали до гіпертонічного середовища, що мав температуру 0 °С, перед внесенням до нього клітин [3].

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

Значення максимальної антигемолітичної активності (АГ_{макс}) амфифільної сполуки розраховували за формулою:

$$АГ_{макс} = \frac{k - a}{k} \times 100\%,$$

де: k — величина гемолізу еритроцитів за відсутності амфифільної сполуки; a — мінімальна величина гемолізу еритроцитів у присутності амфифільної сполуки.

Плато представляє собою діапазон концентрацій амфифільних сполук, в межах якого спостерігається мінімальний гемоліз еритроцитів, а середня ефективна концентрація ($C_{сер. еф.}$) — це концентрація речовини, яка відповідає середині плато.

Капілярний електрофорез проводили наступним чином. Еритроцити інкубували в розчині, що містить 1,2 моль/л NaCl, при температурі 37 °С протягом 10 і 120 хв. По завершенню інкубаційного періоду проби двічі центрифугували при 1000 g протягом 5 хв і ретельно видаляли надосад. Аліквоту осаду гемолізували в дистильованій воді, за допомогою ТХУ осаджували білки на холоді, після чого в надосаді визначали концентрацію катіонів

Na⁺ за допомогою методу капілярного електрофорезу [7, 8]. У роботі використовували установку капілярного електрофорезу «Капель-103Р» (НВФ «Люмекс», Санкт-Петербург, Росія) з фотометричним детектором (254 нм) і кварцевим капіляром діаметром 75 мкм, загальною довжиною 60 см і ефективною — 50 см.

У роботі використовували наступні сполуки: децилсульфат натрію (СинтезПАР), додецил-β,D-мальтозид (Calbiochem), трифторперазин (Sigma) та реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації «х. ч.» і «ч. д. а».

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою Манна-Уїтні і ANOVA тестів [StatgraphWin]. Відмінності між групами вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати й обговорення

Для вивчення чутливості еритроцитів ссавців до гіпертонічного криогемолізу клітини охолоджували від 37 до 0 °С в середовищах, що містять різні концентрації NaCl (рис. 1).

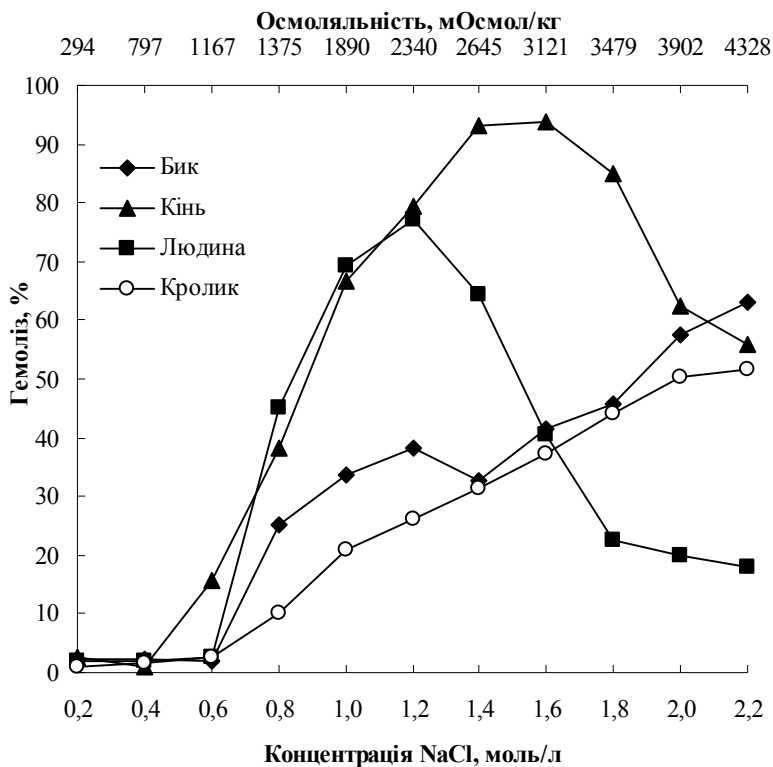


Рис. 1. Залежності рівня гемолізу еритроцитів ссавців від концентрації NaCl в середовищі при охолодженні від 37 до 0 °С. Кількість спостережень у кожній групі — 7

Порівняльне дослідження гіпертонічного криогемолізу еритроцитів різних видів ссавців дозволило виявити певні відмінності в чутливості клітин до охолодження у гіпертонічних середовищах.

Представлені на рисунку 1 залежності мають різний характер. Для еритроцитів людини і коня залежності характеризуються немонотонністю, що проявляється в наявності певного

максимуму (для людини — 1,2; коня — 1,4–1,6 моль/л NaCl) з подальшим зниженням рівня ушкодження. Залежності гіпертонічного криогемолізу еритроцитів бика і кролика практично монотонні, тобто рівень пошкодження збільшується зі зростанням концентрації солі в середовищі.

Добре виражене зниження рівня ГК еритроцитів людини в середовищах, що містять сіль у концентраціях вище

1,2 моль/л, може бути обумовлено певною «адаптацією» клітин до ГК. Деякі автори [9] вважають, що на етапі гіпертонічного інкубування клітин відбувається стабілізація мембрани, яка дозволяє еритроцитам легше перенести охолодження, що в підсумку і проявляється в зниженні рівня ГК у вищевказаних умовах.

Щоб дослідити стан еритроцитарної мембрани при різному осмотичному навантаженні клітин при їх охолодженні від 37 до 0 °С, були обрані ті середовища, в яких спостерігається або достатньо виражений рівень ГК еритроцитів людини і коня (1,2 моль/л NaCl), або наступне зниження рівня їх пошкодження (2,1 моль/л NaCl) (рис. 1). У порівняльному аспекті проведено вивчення чутливості еритроцитів людини, коня, бика і кролика до охолодження у вищевказаних середовищах у присутності амфіфільних сполук, що відносяться до різних класів. Аніонні амфіфіли представлені децилсульфатом натрію (С10), катіонні — трифторперазином (ТФП) і неіонні — додецил- β ,D-мальтозидом (ДМ)

Для всіх досліджуваних амфіфільних речовин були зняті концентраційні залежності гіпертонічного криогемолізу еритроцитів ссавців у середовищі, що містить 1,2 або 2,1 моль/л NaCl. З отриманих залежностей були визначені параметри ефективності цих амфіфільних сполук (значення ефективних концентрацій і величини максимальної антигемолітичної активності).

У таблиці представлені величини плато і значення середніх ефективних концентрацій амфіфільних сполук при гіпертонічному криогемолізі еритроцитів ссавців у середовищі, що містить 1,2 або 2,1 моль/л NaCl.

Видно, що в умовах гіпертонічного криогемолізу в середовищі, що містить 1,2 моль/л NaCl, С10 проявляє антигемолітичну активність у дуже широкому концентраційному діапазоні (плато охоплює більше 100 мкмоль/л), у той час як ДМ і ТФП мають невелике за протяжністю плато. У середовищі, що

містить 2,1 моль/л NaCl, плато значно звужується і зміщується в бік менших концентраційних значень для всіх досліджуваних речовин. Крім того, в цих умовах спостерігається зниження середніх ефективних концентрацій сполук. Явище гіпертонічного криогемолізу пов'язують із розвитком трансмембранних мікрodefektів у мембрані еритроцитів, що з'являються на етапі інкубації клітин у гіпертонічному середовищі при температурі 37 °С, які на етапі охолодження збільшуються до розміру гемолітичних пор. На першій стадії гіпертонічного криогемолізу еритроцитів під час їх інкубації в гіпертонічному середовищі при температурі 37 °С спостерігається вихід іонів K^+ з клітин через трансмембранні мікрodefekти [10], що супроводжується гемолізом клітин при подальшому їх охолодженні до 0 °С [11].

Захисний ефект амфіфільних сполук в умовах стресу еритроцитів пов'язують зі здатністю їх молекул вбудовуватися в еритроцитарну мембрану і пертурбувати її. Таким чином, амфіфіли перешкоджають росту трансмембранних дефектів до розміру гемолітичної пори. Використовувані в роботі амфіфіли розподіляються у внутрішньому (ТФП) і зовнішньому моношарі еритроцитарної мембрани (С10 і ДМ), про що свідчать морфологічні дослідження, представлені в роботі [12].

Для еритроцитів ссавців практично не виявлено відмінностей за розмірами плато і значенням ефективних концентрацій позитивно зарядженого ТФП. Це може бути обумовлено високим ступенем пертурбації еритроцитарної мембрани при вбудовуванні молекул ТФП у внутрішній моношар ліпідного бішару, що нівелює вплив видових особливостей мембран еритроцитів різних видів ссавців на прояв ефективності цієї сполуки.

Як видно з таблиці, у разі використання негативно зарядженого С10 встановлені певні відмінності за розмірами плато і значенням ефективних концентрацій амфіфіла при ГК еритроцитів ссавців. Оскільки ця речовина вбудовується

в зовнішній моношар еритроцитарної мембрани і, отже, його сила пертурбації менш виражена (в порівнянні з катіонною

речовиною), то ефективність С10, в значній мірі, залежить від видових особливостей еритроцитарних мембран.

Таблиця

Значення середніх ефективних концентрацій ($C_{\text{сер. еф.}}$) і розмірів плато для амфіфільних сполук при гіпертонічному криогемолізі еритроцитів ссавців у середовищі, що містить 1,2 і 2,1 моль/л NaCl

Амфіфільні сполуки		NaCl, моль/л	людина	кролик	бик	кінь
С10	Плато, мкмоль/л	1,2	50±18÷160±20	30±7÷400±7	80±13÷280±30	60±15÷280±30
		2,1	20±4÷30±5	30±13÷100±13	40±5÷120±5	30±3÷50±16
	$C_{\text{сер. еф.}}$	1,2	105±5	215±10	180±9	170±10
		2,1	25±4	65±10	80±0	40±9
ДМ	Плато, мкмоль/л	1,2		3±1÷18±1	2±0÷6±1	6±3÷10±3
		2,1		2±1÷4±1	3±1	4±1
	$C_{\text{сер. еф.}}$	1,2		10±0	4±2	8±3
		2,1		3±1	3±1	4±1
ТФП	Плато, мкмоль/л	1,2	40±6÷60±14	40±5÷80±11	40±4÷80±6	50±5÷70±10
		2,1	30±6	30±5÷40±6	30±4÷40±5	30±7
	$C_{\text{сер. еф.}}$	1,2	50±10	60±4	60±2	60±6
		2,1	30±3	35±6	35±2	30±4

Значення максимальної антигемолітичної активності амфіфільних сполук при гіпертонічному криогемолізі еритроцитів ссавців представлені на рисунку 2. В умовах ГК еритроцитів ссавців, який розвивається в 1,2 моль/л NaCl, катіонний ТФП володіє значною захисною дією і його максимальна антигемолітична активність становить 60–80 %.

Підвищення концентрації солі до 2,1 моль/л NaCl призводить до зниження ефективності ТФП в умовах гіпертонічного криогемолізу еритроцитів ссавців. Так, антигемолітична активність цієї сполуки для еритроцитів людини зменшується в 1,6, для клітин коня і бика — в 2–3, а для еритроцитів кролика — більш ніж в 4 рази.

Аніонний С10 набагато більш ефективний для еритроцитів тварин, ніж для еритроцитів людини при охолодженні клітин в середовищі, що містить 1,2 моль/л NaCl (рис. 2). Зі збільшенням концентрації солі до 2,1 моль/л антигемолітична активність цієї сполуки знижується в 2 рази для всіх досліджуваних клітин, за винятком

еритроцитів бика, для яких спостерігається зниження всього в 1,3 раза.

В умовах ГК (1,2 моль/л NaCl) неіонний ДМ проявляє антигемолітичну активність тільки відносно еритроцитів тварин, але не є ефективним для клітин людини (рис. 2). Антигемолітична активність сполуки коливається в межах 20–40 %. У середовищі, що містить 2,1 моль/л NaCl, відбувається статистично значуще зниження антигемолітичної активності ДМ у випадку еритроцитів кролика і бика.

Таким чином, при збільшенні концентрації солі в середовищі інкубації до 2,1 моль/л NaCl ефективність амфіфільних сполук знижується в умовах ГК всіх досліджуваних клітин (рис. 2, табл.), незважаючи на те, що зі збільшенням тоничності середовища початковий рівень гіпертонічного криогемолізу еритроцитів бика і кролика збільшується, а клітин людини і коня — зменшується.

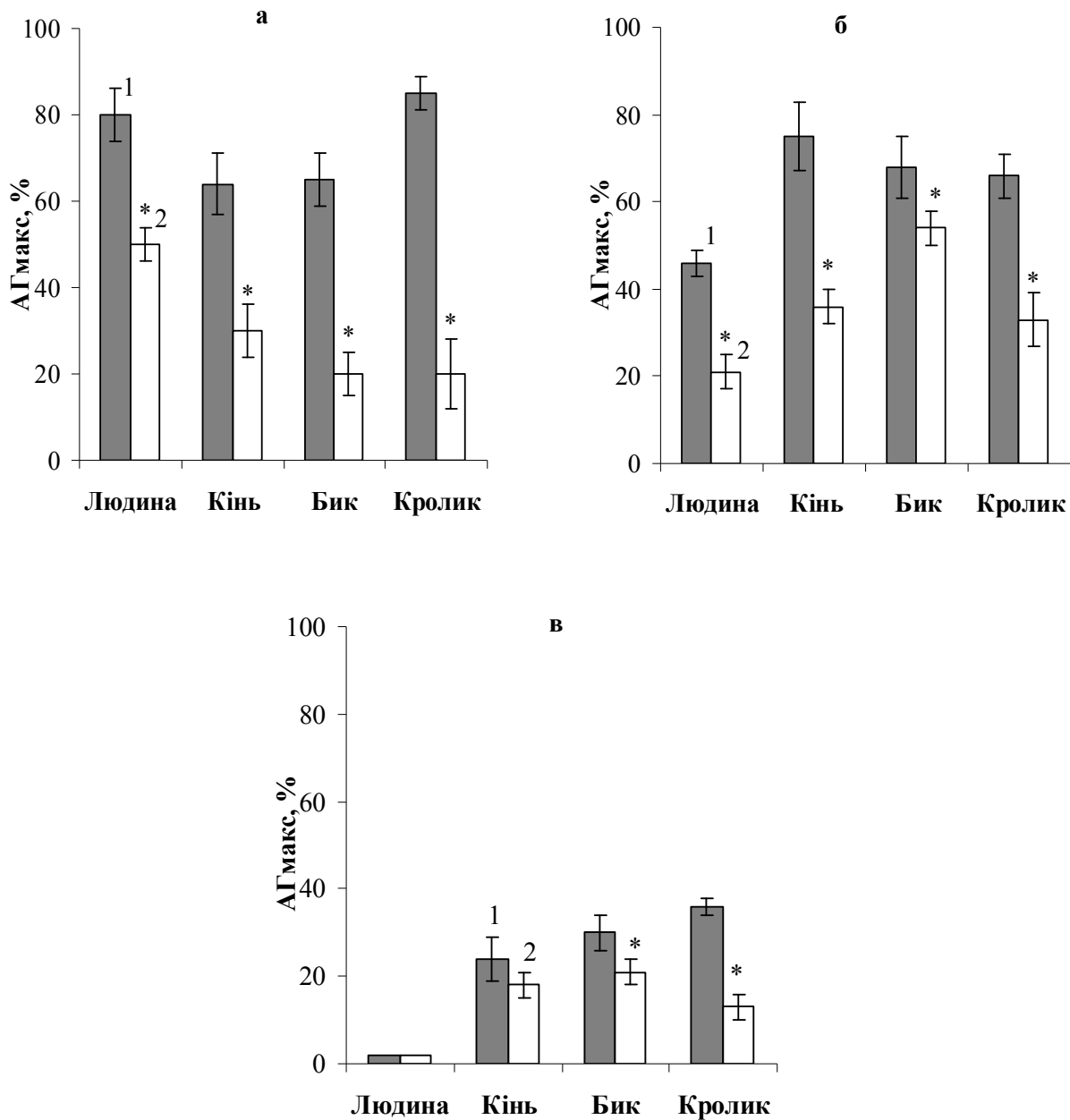


Рис. 2. Максимальна антигемолітична активність ТФП (а), С10 (б), ДМ (в) при гіпертонічному криогемолізі еритроцитів ссавців у середовищі, що містить 1,2 (1) і 2,1 моль/л NaCl (2).

Примітка: * — Статистично значущі відмінності в порівнянні з контролем ($p < 0,05$); кількість спостережень у кожній групі — 6

Зниження антигемолітичної активності амфіфілів при гіпертонічному криогемолізі в 2,1 моль/л NaCl може бути пов'язано з тим, що в середовищі з більшою тоничністю щільність упаковки компонентів мембрани підвищується і, відповідно, знижується її плинність [1, 13]. Зокрема, відомо, що при підвищенні осмолярності NaCl динаміка жирнокислотних радикалів фосфоліпідів

значно пригнічується [1]. Можливо, в умовах більш щільно упакованих компонентів мембрани здатність амфіфілів викликати її реорганізацію знижується, що проявляється у зниженні антигемолітичної активності амфіфільних сполук. Крім того, в середовищі, що містить 2,1 моль/л NaCl, можливість амфіфілів вбудовуватися в мембрану обмежена більшою мірою, ніж в 1,2 моль/л NaCl, про що свідчить зсув

ефективних концентрацій у бік більш низьких значень і звуження плато для всіх використовуваних сполук, так як, ймовірно, амфіфіли вбудовуються в мембрану і пертурбують її тільки в доступних ділянках.

Особливості розвитку гіпертонічного криогемолізу еритроцитів ссавців (рис. 1) можуть бути пов'язані з характеристикою їх плазматичної мембрани як бар'єру. Зокрема, якщо позаклітинні катіони Na^+ можуть перетинати еритроцитарну мембрану за концентраційним градієнтом, то це призведе до його зниження на мембрані і, як наслідок, до зменшення гемолітичного пошкодження клітин при охолодженні.

Для перевірки цього припущення були обрані еритроцити людини і бика, які мають різний характер розвитку ГК (рис. 1). Методом капілярного електрофорезу визначали внутрішньоклітинний вміст іонів Na^+ в еритроцитах, які інкубувалися в 1,2 моль/л

розчині NaCl при 37 °C протягом 10 і 120 хв. Дані представлені на рисунку 3.

Видно, що для клітин людини з часом спостерігається підвищення внутрішньоклітинного вмісту Na^+ на відміну від еритроцитів бика, для яких статистично значущих відмінностей виявити не вдалося. Таким чином, пригнічення ГК еритроцитів людини при тривалому інкубуванні в гіпертонічних умовах при 37 °C може бути обумовлено зниженням концентраційного градієнту катіонів Na^+ на еритроцитарній мембрані, що є результатом входу катіонів натрію в клітину на етапі, який передуює охолодженню. Оскільки ефекти осмоляльності, температури та тривалості їх дії на еритроцити ссавців є неспецифічними [14], то можна вважати, що зменшення концентраційного градієнту катіонів Na^+ на еритроцитарній мембрані є причиною для зниження ГК і у висококонцентрованому сольовому середовищі (2,1 моль/л NaCl).

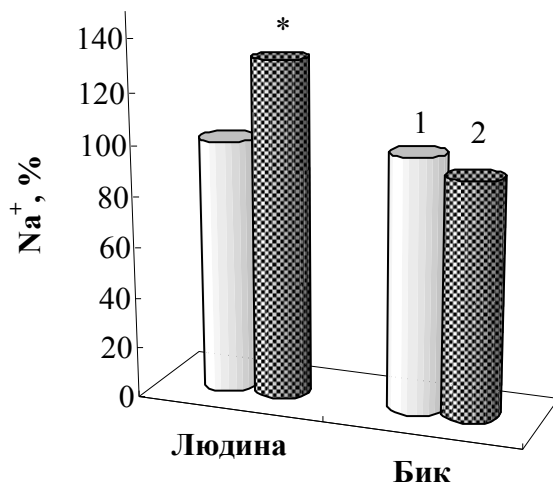


Рис. 3. Внутрішньоклітинний вміст катіонів Na^+ в еритроцитах людини (1) і бика (2) при інкубації в середовищі, що містить 1,2 моль/л NaCl, при 37 °C протягом 10 і 120 хв. За 100 % прийнято внутрішньоклітинний вміст іонів натрію в еритроцитах людини і бика при 10-хвилинному інкубуванні.

Примітка: * — статистично значущі відмінності в порівнянні з результатами при інкубації протягом 10 хв ($p < 0,05$); кількість спостережень у кожній групі — 7

Односпрямованість виявлених закономірностей (зниження антигемолітичної активності всіх амфіфільних речовин з підвищенням концентрації середовища інкубації до 2,1 моль/л NaCl) дозволяє говорити про приховані пошкодження, які накопичуються у мембрані при збільшенні сили стресового чинника. Отже, зниження

рівня ГК еритроцитів людини і коня в 2,1 моль/л NaCl, яке реєструється у відсутність амфіфільних речовин, не є фактичним відображенням поліпшення стану мембрани. На користь цього свідчать і представлені у роботі дані щодо збільшення внутрішньоклітинного вмісту катіонів натрію в еритроцитах людини, які є відображенням

порушення стану еритроцитарної мембрани як бар'єру.

Висновки

1. Досліджувані амфіфільні сполуки підвищують стійкість еритроцитів ссавців до гіпертонічного криогемолізу в 1,2 і 2,1 моль/л NaCl.

2. В умовах гіпертонічного криогемолізу еритроцитів ссавців у середовищі, що містить 2,1 моль/л NaCl, ефективність усіх досліджуваних амфіфільних сполук значно знижується.

3. Для еритроцитів людини з часом спостерігається підвищення внутрішньоклітинного вмісту Na^+ на відміну від еритроцитів бика, для яких статистично значущих відмінностей не виявлено.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження будуть спрямовані на вивчення дії амфіфільних сполук, що належать до різних класів, на мембрану еритроцитів ссавців.

1. Belous A. M., Grishchenko V. I. *Kriobiologiya* [Cryobiology]. Kiev, Naukova Dumka, 1994. 432 p. (In Russian)

2. Shpakova N. M., Bondarenko V. A. Deystviye khlormpromazina na temperaturnuyu i osmoticheskuyu chuvstvitelnost eritrotsitov [Effect of chlorpromazine on temperature and osmotic sensitivity of erythrocytes.]. *Biokhimiya — Biochemistry*, 1991, vol. 56, no. 12, pp. 2125–2130 (in Russian).

3. Shpakova N. M., Pantaler Ye. R., Bondarenko V. A. Antigemoliticheskiy effekt khlormpromazina pri gipertonicheskom i kholodovom shoke eritrotsitov [Antihemolytic effect of chlorpromazine under hypertonic and cold stress of erythrocytes]. *Biokhimiya — Biochemistry*, 1991, vol. 60, no. 10, pp. 1624–1631 (in Russian).

4. Hagerstrand H., Isomaa B. Amphiphile-induced antihaemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation. *Chem.-Biol. Inter.*, 1991, 79, pp. 335–347.

5. Bogner P., Sipos K., Ludany 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.

6. Guerra-Shinohara E. M., Barretto O. C. The erythrocyte cytoskeleton protein 4.2 is not

demonstrable in several mammalian species. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 1999, 32 (6), pp. 683–687.

7. Komarova N. V., Kamentsev Ya. S. Prakticheskoye rukovodstvo po ispol'zovaniyu sistem kapillyarnogo elektroforeza. «KAPEL» [Practical handbook on the use of capel capillary electrophoresis systems]. St. Petersburg, Veda, 2006. 212 p. (In Russian).

8. Polyakova Ye. V., Shuvayeva O. V., Polyanskaya Ye. M. Opredeleniye kationov kaliya, natriya, magniya i kal'tsiya v syvorotke krovi metodom kapillyarnogo elektroforeza [Determination of potassium, sodium, magnesium and calcium in human serum by capillary zone electrophoresis]. *Analitika i kontrol — Analysis and Control*, 2005, vol. 9, no.1, pp. 70–73 (in Russian).

9. Pesina N. I. Razvitiye chuvstvitel'nosti eritrotsitov k okhlazhdeniyu v sredakh, soderzhashchikh neelektrolity. [Development of erythrocyte sensitivity to cooling in media containing non-electrolytes]. *Problemy kriobiologii — Problems of Cryobiology*, 1993, no. 4, pp. 56–57 (in Russian).

10. Shpakova N. M., Êrshov S. S., Nípot O. Ê. Do pitannya pro mozhlivu korelyatsiyu mízh vikhodom ionív K^+ i rozvitkom gemolítichnogo poshkodzhennya yeritrotsitív ssvatsív v umovakh gípertoníchnogo kriogemolízu [To the question about possible correlation between release of K^+ ions and development of hemolytic damage of mammalian erythrocytes under hypertonic cryohemolysis]. *Biologíya tvarin — The Animal Biology*, 2008, vol. 10, no. 1–2, pp. 164–170 (in Ukrainian).

11. Gordiyenko Ye. A., Kovalenko S. Ye. Osnovnyye zakonomernosti yavleniya gipertonicheskogo kriogemoliza [Basic regularities of hypertonic cryohemolysis]. *Problemy kriobiologii — Problems of Cryobiology*, 1997, no. 3, pp. 3–7 (in Russian).

12. Êrshov S. S., Pisarenko N. A., Orlova N. V., Shpakova N. M. Vpliv katiónnikh ta aniónnikh amffíl'nikh spoluk na gípertoníchniy kriogemolíz yeritrotsitív ssvatsív [Effect of cation and anion amphiphilic compounds on hypertonic cryohemolysis of mammal erythrocytes]. *Fiziologichniy zhurnal — Journal of Physiology*, 2007, vol. 53, no. 6, pp. 78–84 (in Ukrainian).

13. Kinnunen P. K. J. Lipid bilayers as osmotic response elements. *Cell. Physiol. Biochem.*, 2000, 10 (5–6), pp. 243–250.

14. Shpakova N. M., Ershov S. S., Orlova N. V. Hypertonic cryohemolysis in bovine, equine, canine and human erythrocytes: osmotic and temperature peculiarities. *Biologíya tvarin — The Animal Biology*, 2011, vol. 13, no 1–2, pp. 320–328