

Влияние амфифильных веществ на гипертонический гемолиз эритроцитов, модифицированных температурой 49°C

UDC 57.043:612.111:352.462

N.A. PISARENKO, N.M. SHPAKOVA*

Effect of Amphiphiles on Hypertonic Hemolysis of Erythrocytes, Modified with Temperature of 49°C

Исследовали влияние тепловой предобработки эритроцитов человека и быка на их чувствительность к гипертоническому стрессу (4,0 моль/л NaCl) при температуре 37 и 0°C. Показано, что инкубация клеток при 49°C, вызывающая денатурацию спектрина, снижает уровень гипертонического повреждения эритроцитов человека и не влияет на сохранность эритроцитов быка при 37°C. При 0°C гипертонический гемолиз модифицированных эритроцитов млекопитающих не изменяется. Денатурация спектрина цитоскелета эритроцитов человека и быка приводит к снижению антигемолитического действия амфифильных веществ (децилсульфата натрия, додецил- β ,D-мальтозида, трифторперазина) при температуре 37 и 0°C.

Ключевые слова: гипертонический стресс, эритроциты, спектрин, амфифильные соединения.

Досліджували вплив теплової передобробки еритроцитів людини і бика на їх чутливість до гіпертонічного стресу (4,0 моль/л NaCl) при температурі 37 і 0°C. Показано, що інкубування клітин при 49°C, яка викликає денатурацію спектрину, знижує рівень гіпертонічного пошкодження еритроцитів людини і не впливає на стійкість еритроцитів бика при 37°C. При 0°C гіпертонічний гемолиз модифікованих еритроцитів ссавців не змінюється. Денатурація спектрину цитоскелета еритроцитів людини і бика знижує антигемолітичну дію амфифільних сполук (децилсульфату натрію, додецил- β ,D-мальтозиду, трифторперазину) при температурі 37 і 0°C.

Ключові слова: гіпертонічний стрес, еритроцити, спектрин, амфифільні сполуки.

The effect of thermal pre-treatment of human and bovine erythrocytes on their sensitivity to hypertonic stress (4.0 mol/l NaCl) at 37 and 0°C was studied. It has been shown that cell incubation at 49°C, causing spectrin denaturation, decreases the level of human erythrocyte hypertonic damage and does not affect the integrity of bovine erythrocytes at 37°C. Hypertonic hemolysis of modified mammalian erythrocytes does not change at 0°C. Cytoskeletal spectrin denaturation of bovine and human erythrocytes results in reduction of antihemolytic activity of amphiphilic substances (sodium decyl sulfate, dodecyl- β ,D-maltoside, trifluoroperazine) at 37 and 0°C.

Key words: hypertonic stress, erythrocytes, spectrin, amphiphilic compounds.

Предполагают, что одна из основных причин повреждения клеток при замораживании – концентрирование внеклеточного раствора, связанное с вымерзанием воды [2, 15]. Экспериментальной моделью для изучения данного фактора криоповреждения является гипертонический стресс.

Агрегатное и структурное состояние белков цитоскелета влияет на степень их ассоциации с якорными белками мембраны, поддерживает вязкоэластические свойства мембраны и устойчивость клетки к действию стресса [2]. Поэтому модификация цитоскелетных белков имеет важное значение для понимания механизмов устойчивости эритроцитов в условиях гипертонического стресса. Исходя из того, что амфифильные соединения, действие которых реализуется на мембране, значительно снижают уровень повреждения клеток в гипертонических условиях [5], представлял интерес ис-

One of the main reasons of cell damage during freezing is believed to be concentrating of extracellular solution, associated with water freezing [2, 15]. A hypertonic stress is the experimental model for studying this cryodamage factor.

Aggregative and structural state of cytoskeletal proteins affects the degree of their association with anchor proteins of membrane, maintaining viscoelastic properties of membrane and cell resistance to stress effect [2]. Therefore modification of cytoskeletal proteins is important for understanding the mechanisms of erythrocyte resistance under hypertonic stress. Whereas amphiphilic compounds, which effect is realized on membrane, significantly decrease the level of cell damage under hypertonic conditions [5] there was of interest to investigate their antihemolytic activity for erythrocytes with cytoskeleton-membrane complex, modified with the temperature of 49°C.

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38 (057) 373-41-35, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 4135, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

следовать их антигемолитическую активность для эритроцитов с цитоскелет-мембранным комплексом, модифицированным температурой (49°C).

Цель работы – исследовать влияние предварительной инкубации эритроцитов человека и быка при 49°C на их чувствительность к гипертоническому стрессу (4,0 моль/л NaCl) и эффективность амфифильных соединений в данных стрессовых условиях.

Материалы и методы

Для исследования использовали эритроциты, полученные из крови человека и быка, заготовленной на консерванте “Глюглицир”. Эритроциты выделяли по стандартной методике [5].

В работе были использованы децилсульфат натрия (“СинтезПАВ”, Россия), додецил-β, D-мальтозид (“Calbiochem”, США), трифторперазин (“Sigma”, США) и реактивы отечественного производства квалификации “х. ч.” и “ч. д. а.”.

Гипертонический стресс эритроцитов осуществляли путем переноса аликвоты суспензии эритроцитов в 1 мл раствора, содержащего 4,0 моль/л NaCl, на 5 мин при температуре 37 или 0°C. Конечный гематокрит составлял 0,4%. Амфифильные соединения добавляли в гипертоническую среду перед внесением в нее клеток [5].

Эритроциты млекопитающих (гематокрит 25%) инкубировали при температуре 49°C (термостат U4, Германия) в течение 10 мин.

Содержание гемоглобина в супернатанте определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 543 нм. За 100% принимали поглощенные пробы, в которую добавляли тритон X-100 (0,1%).

Значение максимальной антигемолитической активности (AG_{max}) амфифильного соединения рассчитывали по формуле

$$AG_{max} = \frac{k - a}{k} \times 100\%,$$

где k – величина гемолиза эритроцитов при отсутствии амфифильного вещества; a – минимальная величина гемолиза эритроцитов при наличии амфифильного вещества.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью тестов ANOVA и критерия Манна-Уитни (StatgraphWin). Расхождения между группами считали достоверными при $P_U < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Согласно полученным результатам (рис. 1) в гипертонических условиях исходный уровень повреждения эритроцитов исследуемых млекопитающих зависит от видовой принадлежности клеток

The research aim was to study the effect of preliminary incubation of bovine and human erythrocytes at 49°C on their sensitivity to hypertonic stress (4.0 mol/l NaCl) and efficiency of amphiphilic compounds under these stress conditions.

Materials and methods

Erythrocytes, derived from human and bovine blood, prepared with “Glugicir” preservative were used for the research. Erythrocytes were derived according to the standard method [5].

Sodium decyl sulfate (Sintez PAV, Russia), dodecyl-β, D-maltoside (Calbiochem, USA), trifluoroperazine (Sigma, USA) and nationally produced reagents with “chemically pure” and “pure for analysis” grades were used in the research.

Hypertonic stress of erythrocytes was performed by transfer of erythrocyte suspension aliquot into 1 ml of solution, containing 4.0 mol/l NaCl for 5 min at 37 or 0°C. Final hematocrit was 0.4%. Amphiphilic compounds were added into the hypertonic medium prior to transfer of the cells [5].

Mammalian erythrocytes (25% hematocrit) were incubated at 49°C (thermostat U4, Germany) for 10 min.

Hemoglobin content in supernatant was spectrophotometrically examined at 543 nm. The absorption of the sample with Triton X-100 (0.1%) added was assumed as 100%.

The value of maximum antihemolytic activity (AH_{max}) of amphiphilic compound was calculated by the formula:

$$AH_{max} = \frac{k - a}{k} \times 100\%,$$

where k is erythrocyte hemolysis value at the absence of amphiphile; a is minimum value of erythrocyte hemolysis at amphiphile presence.

The results were statistically processed with ANOVA tests and Mann-Whitney criterion (StatgraphWin). The differences among the groups were significant at $P_U < 0.05$.

Results and discussion

According to the findings (Fig. 1) under hypertonic conditions the initial level of erythrocyte damage of the studied mammals depends on cell origin and experimental temperature. Thus, human erythrocyte lysis level in 4.0 mol/l NaCl at 37°C makes 90%, but at temperature reduction down to 0°C does 55%. Bovine erythrocyte hemolysis level at 37°C makes 90%, whereas at 0°C does only 10%. Thus, during the medium temperature reduction the resistance of bovine erythrocytes increases more than 9 times, which is obviously caused by the peculiarities of erythrocyte membrane phospholipid composition in this species: high content

и температуры проведения эксперимента. Так, уровень лизиса эритроцитов человека в 4,0 моль/л NaCl при 37°C составляет 90%, а при снижении температуры до 0°C – 55%. Уровень гемолиза эритроцитов быка при 37°C составляет 90%, тогда как при 0°C – лишь 10%. Таким образом, при снижении температуры среды устойчивость эритроцитов быка возрастает более чем в 9 раз, что, очевидно, обусловлено особенностями фосфолипидного состава мембран эритроцитов данного вида – высоким содержанием сфингомиелина (СМ) и отсутствием фосфатидилхолина (ФХ) [6, 7].

В основе повреждающего действия гипертонического стресса лежат процессы, обуславливающие формирование трансмембранных пор, соизмеримых по размерам с молекулами гемоглобина. Показано [3], что при низкой температуре (ниже 15°C) инициация трансмембранных дефектов под влиянием гипертонии и их количество резко снижаются, что объясняется ограничениями, связанными с влиянием температуры на диффузию компонентов мембраны, и повышением плотности упаковки мембранных липидов [2, 12, 14]. Следовательно, можно предположить, что в условиях гипертонического стресса при 0°C в мембране, характеризующейся более плотной упаковкой липидов в латеральной плоскости, процессы инициации дефектов и последующего их развития затруднены.

Предварительная модификация цитоскелета эритроцитов человека при 49°C значительно снижает их чувствительность к гипертоническому воздействию при 37°C, а чувствительность эритроцитов быка не изменяется (рис. 1). В условиях ги-

of sphingomyelin (SM) and the absence of phosphatidylcholine (PC) [6, 7].

The processes stipulating the formation of transmembrane pores, comparable on dimensions with hemoglobin molecules are the bases of damaging effect of hypertonic stress. It has been shown [3] that under low temperatures (below 15°C) the initiation of transmembrane defects under hypertonia and their number sharply decrease, because of the limitations, associated with temperature effect on diffusion of membrane components, and of increase of membrane lipids' packing density [2, 12, 14]. Therefore, it may be suggested that under hypertonic stress at 0°C the processes of defects' initiation and their further developing are complicated in membrane, characterizing more compact packing of the lipids in lateral plane.

The preliminary cytoskeletal modification of human erythrocytes at 49°C significantly decreases their sensitivity to hypertonic effect at 37°C, while sensitivity of bovine erythrocytes does not change (Fig. 1). Modification of cell cytoskeleton does not affect the sensitivity of the studied mammalian erythrocytes under hypertonic stress at 0°C.

It has been known that incubation of mammalian erythrocytes at 49°C results in denaturation of cytoskeletal proteins, particularly spectrin [8, 13], being the main protein component of erythrocyte cytoskeleton, forming filament network on cytoplasmatic membrane surface [17]. It is supposed [3, 13] that spectrin denaturation, changing conformation of protein molecules, reduces their ability to interact with membrane components. As a result the stabilizing effect of cytoskeleton on cell membrane may be decreased, making difficult

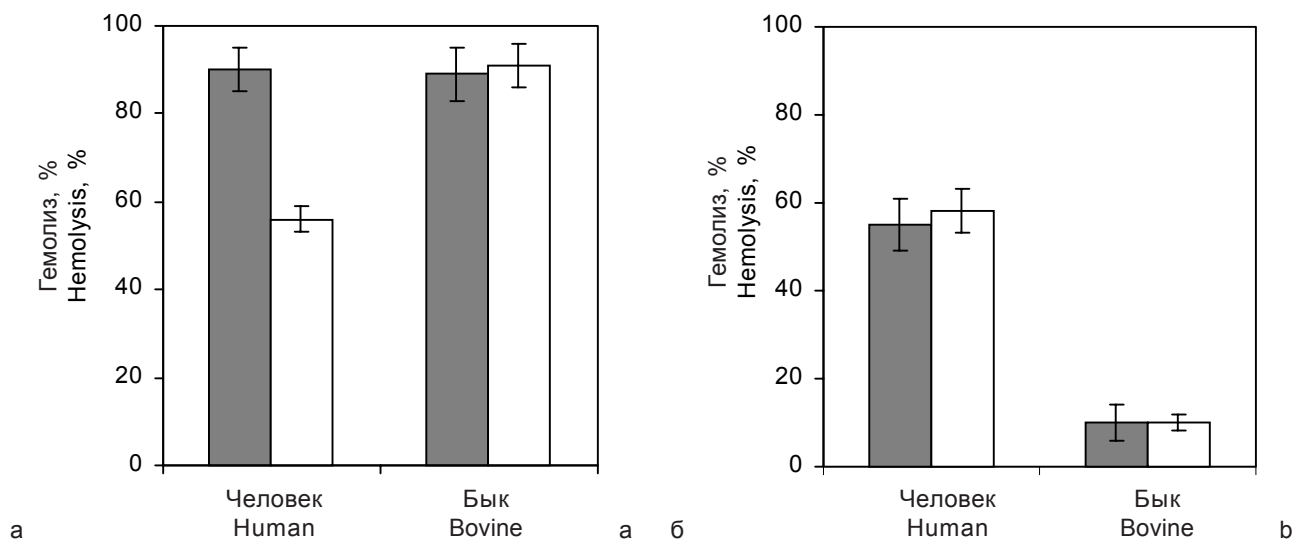


Рис. 1. Уровень гемолиза эритроцитов человека и быка в условиях гипертонического стресса (4,0 моль/л NaCl) при температуре 37 (а) и 0°C (б): ■ – нативные клетки (контроль); □ – клетки, инкубированные при 49°C.

Fig. 1. Hemolysis level of human and bovine erythrocytes under hypertonic stress (4.0 mol/l NaCl) at 37 (a) and 0°C (b): ■ – native cells (the control); □ – the cells, incubated at 49°C.

пертоического стресса при 0°C модификация цитоскелета клеток не влияет на чувствительность эритроцитов исследуемых млекопитающих.

Известно, что инкубация эритроцитов млекопитающих при 49°C приводит к денатурации цитоскелетных белков, в частности спектрина [8, 13], который является основным белковым компонентом эритроцитарного цитоскелета, формирующим филаментную сеть на цитоплазматической поверхности мембраны [17]. Полагают [3, 13], что денатурация спектрина, изменяющая конформацию белковых молекул, снижает их способность к взаимодействию с компонентами мембраны. В результате этого может уменьшиться стабилизирующее влияние цитоскелета на мембрану клетки, что затруднит формирование трансмембранных пор, и приведет к снижению чувствительности эритроцитов человека к гипертоническому стрессу при 37°C.

Отсутствие изменений в чувствительности к гипертоническому стрессу в 4,0 моль/л NaCl термически модифицированных эритроцитов быка, возможно, связано с особенностями фосфолипидного состава мембран эритроцитов данного вида (высокое содержание СМ наряду с отсутствием ФХ) [6, 7]. Высокое содержание СМ в эритроцитарной мембране уменьшает текучесть клеточной мембраны, увеличивая ее жесткость, а наличие ФХ оказывает противоположное действие [17]. Следовательно, дополнительное влияние термической модификации, оказывающей подобное влияние на состояние мембраны клетки, а именно уменьшение ее текучести [10, 11, 13], малоэффективно. Кроме того, реакция эритроцитов быка на нагревание значительно отличается и на клеточном уровне. Нагревание эритроцитов быка приводит к изменению их формы от дискоцитов к стоматоцитам [13], а эритроцитов человека от дискоцитов к эхиноцитам [16].

Для изучения влияния амфифильных веществ на уровень гипертонического стресса эритроцитов млекопитающих использовали амфифилы, относящиеся к различным классам поверхностно-активных веществ: анионный децилсульфат натрия (С10), катионный трифторперазин (ТФП), неионный додецил-β, D-мальтозид (ДМ) [1]. Были получены зависимости уровня гипертонического гемолиза клеток в среде, содержащей 4,0 моль/л NaCl, от концентрации амфифилов при 37 и 0°C. Из полученных концентрационных зависимостей были рассчитаны величины максимальной антигемолитической активности (AG_{max}) и значения эффективных концентраций ($C_{AG_{max}}$), которые характеризуют эффективность исследуемых амфифильных соединений в условиях гипертонического стресса эритроцитов.

Антигемолитическую активность амфифильного соединения выражали как процент снижения гемолиза клеток при наличии веществ по отноше-

the formation of transmembrane pores and resulting in decrease of sensitivity of human erythrocytes to hypertonic stress at 37°C.

The absence of changes in hypertonic stress sensitivity in 4.0 mol/l NaCl solution for thermally modified bovine erythrocytes, may be associated with the peculiarities of phospholipid composition of erythrocyte membranes in this species (high content of SM with the absence of PC) [6, 7]. High content of SM in erythrocyte membrane decreases fluidity of cell membrane, increasing its rigidity and the presence of PC has an opposite effect [17]. Therefore, additional effect of thermal modification, similarly affecting the cell membrane state, namely the reduction of its fluidity [10, 11, 13] is inefficient. In addition, the response of bovine erythrocytes to warming also significantly differs at cellular level. Heating the bovine erythrocytes results in the change of their shape from discocytes to stomatocytes [13], while human erythrocytes transform from discocytes to echinocytes [16].

For studying the effect of amphiphilic compounds on the level of hypertonic stress of mammalian erythrocytes the amphiphiles, referred to different classes of surface-active substances as: anionic sodium decyl sulfate (C10), cationic trifluoroperazine (TFP), non-ionic dodecyl-β, D-maltoside (DM) [1] were used. The amphiphile concentration-dependencies of hypertonic hemolysis level of cells in the medium, containing 4.0 mol/l NaCl, were obtained at 37 and 0°C. The values of maximum antihemolytic activity (AH_{max}) and the values of effective concentrations ($C_{AH_{max}}$), characterizing efficiency of the studied amphiphilic compounds under hypertonic stress of erythrocytes were calculated from the obtained concentration dependencies.

Antihemolytic activity of an amphiphilic compound was expressed as the percentage of cell hemolysis reduction in the presence of substances in respect of hemolysis in the sample without amphiphiles. Amphiphilic compound concentration of substance, wherein minimum cell lysis was observed, was assumed as an effective concentration.

Fig. 2 represents the values of maximum antihemolytic activity of amphiphilic compounds under hypertonic stress of native and modified human erythrocytes at 37(a) and 0°C (b). TFP and C10 have the most antihemolytic activity for native human erythrocytes at 37°C (85–90%). DM has a lower protective effect. Antihemolytic activity of amphiphiles at 0°C significantly decreases and is within the range of 40–50%. Effective concentrations, whereat minimum cell lysis is observed, shift towards the lower values (Table).

All the studied substances under hypertonic hemolysis of erythrocytes, warmed up to 49°C, manifest antihemolytic activity, however it decreases both at 37 and 0°C.

The similar results obtained for native and modified bovine erythrocytes are presented in Fig. 3. Evidently,

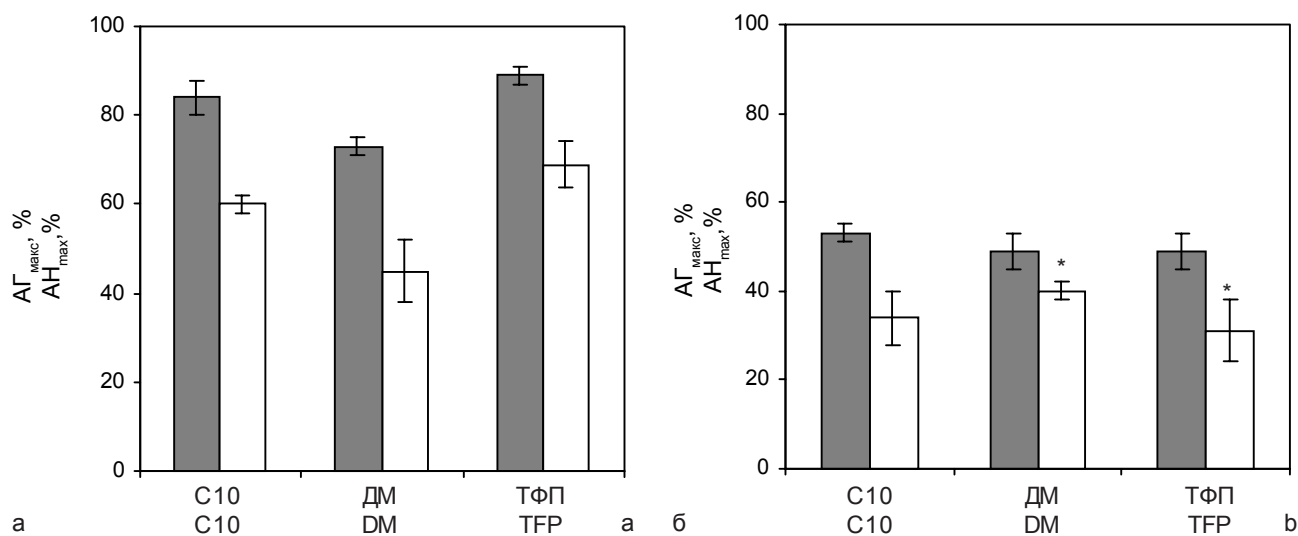


Рис. 2. Максимальная антигемолитическая активность амфифильных соединений в условиях гипертонического стресса эритроцитов человека при температуре 37 (а) и 0°C (б): ■ – нативные клетки (контроль); □ – клетки, инкубированные при 49°C; * – достоверно по сравнению с нативными клетками, $P_U < 0,05$.

Fig. 2. Maximum antihemolytic activity of amphiphilic compounds under hypertonic stress of human erythrocytes at 37 (a) and 0°C (b): ■ – native cells (the control); □ – the cells, incubated at 49°C; * – significant if compared with native cells, $P_U < 0,05$

нию к гемолизу в пробе, не содержащей амфифил. За эффективную концентрацию амфифильного соединения принимали концентрацию вещества, при которой наблюдается минимальный лизис клеток.

На рис. 2 приведены значения максимальной антигемолитической активности амфифильных соединений в условиях гипертонического стресса нативных и модифицированных эритроцитов человека при 37 и 0°C. Для нативных эритроцитов человека наибольшей антигемолитической активностью при температуре 37°C обладают ТФП и С10 (85–90%). Несколько меньшее защитное действие оказывает ДМ. При температуре 0°C антигемолитическая активность амфифилов значительно снижается и находится в диапазоне 40–50%. Эффективные концентрации, при которых наблюдается минимальный лизис клеток, сдвигаются в сторону меньших значений (таблица).

Все исследуемые вещества в условиях гипертонического гемолиза эритроцитов, прогретых до 49°C, проявляют антигемолитическую активность, однако она снижается как при 37, так и 0°C.

Аналогичные результаты, полученные для нативных и модифицированных эритроцитов быка, представлены на рис. 3. Видно, что для эритроцитов быка, как и для эритроцитов человека, максимальным защитным дейст-

for bovine erythrocytes as well as for human ones C10 and TFP had the maximum protective effect under hypertonic stress (80–85%), efficiency of DM is lower. Effective concentrations of substances for bovine erythrocytes are higher, than for human cells, excluding TFP, which effective concentrations coincide for human and bovine cells (Table).

Antihemolytic activity of the studied amphiphilic compounds for temperature-modified bovine erythrocytes decreases if compared with the effect in native cells. Herewith reduction of C10 and DM efficiency makes about 20%, while protective effect of TFP decreases more than twice. For modified bovine eryth-

Значения эффективных концентраций (C_{AHmax}) амфифильных соединений при гипертоническом стрессе эритроцитов человека и быка в среде, содержащей 4,0 моль/л NaCl, при температуре 37 и 0°C. Values of effective concentrations (C_{AHmax}) of amphiphilic compounds under hypertonic stress of human and bovine erythrocytes in the medium, containing 4.0 mol/l NaCl at 37 and 0°C

Амфифильное соединение Amphiphilic compound	C_{AHmax} , мкмоль/л			
	человека human		быка bovine	
	37°C	0°C	37°C	0°C
С10	45 ± 4	10 ± 1	65 ± 7	–
ДМ DM	8 ± 1	2 ± 1	14 ± 3	–
ТФП TFP	55 ± 6	25 ± 6	50 ± 3	–

вием в условиях гипертонического стресса обладают С10 и ТФП (80–85%), эффективность ДМ несколько ниже. Эффективные концентрации веществ для эритроцитов быка выше, чем для клеток человека, за исключением ТФП, эффективные концентрации которого совпадают для клеток человека и быка (таблица).

Антигемолитическое действие исследуемых амфифильных соединений для эритроцитов быка, модифицированных температурой, снижается по сравнению с нативными клетками. Причем снижение эффективности действия С10 и ДМ составляет около 20%, в то время как защитное действие ТФП уменьшается более чем в 2 раза. Для модифицированных эритроцитов быка, в отличие от нативных клеток, наибольшую антигемолитическую активность проявляют С10 и ДМ (50–60%).

При 0°C изменение антигемолитической активности веществ в условиях гипертонического стресса модифицированных эритроцитов быка не исследовали, так как исходно низкий уровень гемолиза этих клеток не позволяет выявить защитное действие амфифильных соединений.

Встраивание экзогенных амфифильных молекул в плазматическую мембрану эритроцитов сопровождается изменением ее динамической структуры. Мы полагаем, что в условиях гипертонического стресса эритроцитов антигемолитический эффект амфифильных соединений обусловлен способностью их молекул при встраивании в эритроцитарную мембрану разупорядочивать ее структуру и препятствовать развитию трансмембранных дефектов до размера гемолитических пор [4, 5]. Встраивание и распределение экзогенных амфифильных молекул определяются их физико-химическими свойствами и состоянием эритроцитарной мембраны. Жесткость мембраны зависит от состояния мембранных липидов и структурной организации белков цитоскелета [9]. Следовательно, можно предположить, что снижение антигемолитического действия амфифильных соединений в стрессовых условиях в результате инкубации клеток при температуре 49°C может быть обусловлено изменением состояния мембран модифицированных клеток. Известно, что термическая модификация увеличивает вязкость мембран эритроцитов и уменьшает их текучесть [10, 11, 13], т. е. оказывает на клеточную мембрану влияние, противоположное действию амфифилов, что и приводит к снижению способности амфифилов разупорядочивать мембрану и уменьшает их антигемолитическую активность. Это предположение подтверждается и снижением защитного действия амфифильных соединений в условиях гипертонического стресса эритроцитов человека при 0°C. Более жесткая структура плазматической мембра-

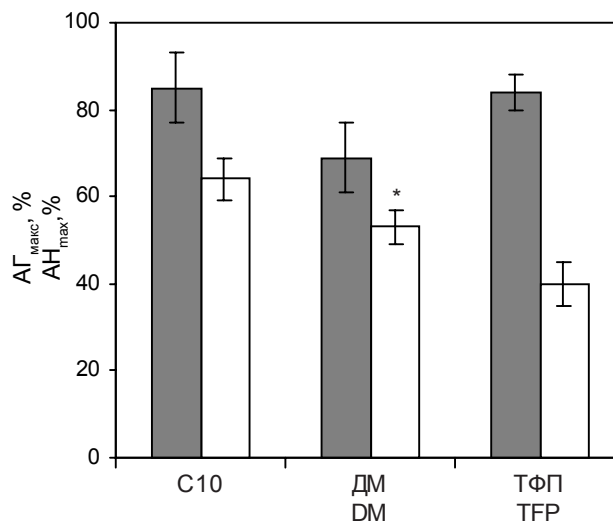


Рис. 3. Максимальная антигемолитическая активность амфифильных соединений в условиях гипертонического стресса эритроцитов быка при температуре 37°C: ■ – нативные клетки (контроль); □ – инкубированные при 49°C; * – достоверно по сравнению с нативными клетками, $P_U < 0,05$.

Fig. 3. Maximum anti-hemolytic activity of amphiphilic compounds under hypertonic stress of bovine erythrocytes at 37°C: ■ – native cells (the control); □ – the cells, incubated at 49°C; * – significant if compared with the native cells, $P_U < 0.05$.

rocytes in respect of the native cells C10 and DM manifest the highest anti-hemolytic activity (50–60%).

The anti-hemolytic activity change of the substances under hypertonic stress of modified bovine erythrocytes was not studied at 0°C, whereas initially low level of hemolysis of these cells do not allow to manifest the protective effect of amphiphilic compounds.

Incorporation of exogenic amphiphilic molecules into erythrocyte plasmatic membrane is accompanied with its dynamical structure change. We suggest that under hypertonic stress of erythrocytes the anti-hemolytic effect of amphiphilic compounds is caused by ability of their molecules to disorder erythrocyte membrane structure after incorporation and prevent development of transmembrane defects up to the dimensions of hemolytic pores [4, 5]. Incorporation and distribution of exogenic amphiphilic molecules are significantly determined by their physical and chemical properties and erythrocyte membrane state. Membrane rigidity depends on the state of membrane lipids and structural organization of cytoskeletal proteins [9]. Therefore, it may be suggested that reduction of anti-hemolytic effect of amphiphilic compounds under stress conditions due to cell incubation at 49°C may be caused by the change of modified cell membrane state. It has been known that thermal modification increases viscosity of erythrocyte membranes and decreases their fluidity [10, 11, 13], *i. e.* has an effect on cell membrane opposite to amphiphiles, resulting in

ны при 0°C, очевидно, приводит к уменьшению способности амфифилов разупорядочивать мембрану (снижению их пертурбирующего действия), что и проявляется в снижении значений антигемолитической активности веществ и их эффективных концентраций.

Таким образом, состояние цитоскелет-мембранного комплекса эритроцитов является важным фактором, определяющим не только чувствительность эритроцитов млекопитающих к гипертоническому стрессу, но и проявление защитного действия амфифильных соединений в стрессовых условиях. Изменение структурно-динамического состояния цитоскелета в результате денатурации спектрина, приводящее к повышению жесткости эритроцитарной мембраны, обуславливает снижение антигемолитической активности исследуемых амфифильных соединений в условиях гипертонического стресса эритроцитов млекопитающих.

Выводы

1. Амфифильные соединения повышают устойчивость эритроцитов человека и быка к гипертоническому стрессу в среде, содержащей 4,0 моль/л NaCl, при 37°C. При 0°C для эритроцитов человека наблюдаются снижение максимальной антигемолитической активности и уменьшение эффективных концентраций амфифилов.

2. В условиях гипертонического стресса при 37°C уровень повреждения термически модифицированных (49°C) эритроцитов человека уменьшается, а быка – не изменяется. При 0°C уровень гипертонического гемолиза модифицированных эритроцитов человека и быка не изменяется.

3. Предварительная инкубация эритроцитов человека и быка при 49°C приводит к снижению эффективности исследуемых амфифильных соединений в условиях гипертонического стресса при 37°C и 0°C.

reduction of amphiphile ability to disorder a membrane and manifest antihemolytic activity. This supposition is also confirmed by the reduction of protective effect of amphiphilic compounds under hypertonic stress of human erythrocytes at 0°C. Obviously, more rigid structure of plasma membrane at 0°C results in decrease of amphiphilic compound ability to disorder a membrane (reduction of their perturbing effect), manifesting in the reduction of antihemolytic activity values of the substances and their effective concentrations.

Thus, the state of erythrocyte cytoskeleton-membrane complex is an important factor, determining both sensitivity of mammalian erythrocytes to hypertonic stress and also manifestation of protective effect of amphiphilic compounds under stress conditions. The change of structure-dynamical state of cytoskeleton due to spectrin denaturation, providing an increase of erythrocyte membrane rigidity results in a decrease of antihemolytic activity of the studied amphiphilic compounds under mammalian erythrocyte hypertonic stress.

Conclusions

1. Amphiphilic compounds increase the resistance of bovine and human erythrocytes to hypertonic stress in the medium, containing 4.0 mol/l NaCl at 37°C. The reduction of maximum antihemolytic activity and decrease of effective concentrations of amphiphiles were observed for human erythrocytes at 0°C.

2. The injury of thermally modified human erythrocytes (49°C) decreases under hypertonic stress at 37°C, and for bovine cells do not change. Hypertonic hemolysis level of human and bovine modified erythrocytes does not change at 0°C.

3. Preliminary incubation of human and bovine erythrocytes results in efficiency reduction of the studied amphiphilic compounds under hypertonic stress at 37 and 0°C.

Литература

1. *Абрамзон А.А.* Поверхностно-активные вещества. Свойства и применение.– Л.: Химия, 1975.– 248 с.
2. *Белоус А.М., Грищенко В.И.* Криобиология.– Киев.: Наук. думка, 1994.– 432 с.
3. *Гулевский А.К., Бондаренко В.А., Белоус А.М.* Барьерные свойства биомембран при низких температурах.– Киев: Наук. думка, 1988.– 206 с.
4. *Цымбал Л.В., Орлова Н.В., Шпакова Н.М.* Модификация хлорпромазином структурно-функционального состояния мембран эритроцитов // Биол. мембраны.– 2005.– Т. 22, №4.– С. 327–335.
5. *Шпакова Н.М., Панталер Е.Р., Бондаренко В.А.* Антигемолитический эффект хлорпромазина при гипертоническом и холодовом шоке эритроцитов // Биохимия.– 1995.– Т. 60, №10.– С. 1624–1631.

References

1. *Abramzon A.A.* Surface-active substances. Properties and application.– Leningrad: Khimiya, 1975.– 248 p.
2. *Belous A.M., Grisichenko V.I.* Cryobiology.– Kiev: Naukova Dumka, 1994.– 432 p.
3. *Gulevskiy A.K., Bondarenko V.A., Belous A.M.* Barrier properties of biomembranes at low temperatures.– Kiev: Naukova Dumka, 1988.– 206 p.
4. *Tsymbal L.V., Orlova N.V., Shpakova N.M.* Modification with chlorpromazine of structural and functional state of erythrocyte membranes // Biol. Membrany.– 2005.– Vol. 22, N4.– P. 327–335.
5. *Shpakova N.M., Pantaler E.R., Bondarenko V.A.* Antihemolytic effect of chlorpromazine under hypertonic and cold stress of erythrocytes// Biokhimiya.– 1995.– Vol. 60, N10.– P. 1624–1631.

6. *Garnier M., de Preville G., Pilardeau P., Boudia D.* Relationship between the intra-erythrocyte sodium composition and the membrane lipoprotein composition among different mammal species // *Comp. Biochem. Physiol.*– 1984.– Vol. 77A, N2.– P. 315–317.
7. *Gimenez G., Florin-Christensen M., Belaunzaran M.L. et al.* Evidence for a relationship between bovine erythrocyte lipid membrane peculiarities and immune pressure from ruminal ciliates // *Vet. Immunol. Immunopathol.*– 2007.– Vol. 119, N3–4.– P. 171–179.
8. *Ivanov I. T.* Changes in passive electric parameters of human erythrocyte membrane during hyperthermia: role of spectrin phosphorylation // *Gen. Physiol. Biophys.*– 1999.– Vol. 18, N2.– P. 165–180.
9. *Katyukhin L.N., Kazennov A.M., Maslova M. N. et al.* Rheologic properties of mammalian erythrocytes: relationship to transport ATPases // *Comp. Biochem. Physiol. Pt B.*– 1998.– Vol. 120, N3.– P. 493–498.
10. *Kucera W., Meier W., Lerche D.* Influence of heat-induced changes in the mechanical properties of the membrane on the filterability of human erythrocytes // *Biomed. Biochim. Acta.*– 1986.– Vol. 45, N3.– P. 353–358.
11. *Lux S.E., John K.M., Ukena T.E.* Diminished spectrin extraction from ATP-depleted human erythrocytes. Evidence relating spectrin to changes in erythrocyte shape and deformability // *Clin. Invest.*– 1978.– Vol. 61, N3.– P. 815–827.
12. *Minetti M., Ceccarini M., Di Stasi A.M.M.* Role of membrane thermotropic properties on hypotonic hemolysis and hypertonic cryohemolysis of human red blood cells // *J. Cell. Biochem.*– 1984.– Vol. 25, N2.– P. 61–72.
13. *Mosior M., Bobrowska M., Gomulkiewicz J.* Effect of the level of ATP and of the state of spectrin on osmotic properties of bovine erythrocytes // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1990.– Vol. 1022, N3.– P. 355–360.
14. *Otten D., Lubbecke L., Beyer K.* Stages of the bilayer-micelle transition in the system phosphatidylcholine-C12E8 as studied by deuterium- and phosphorous-NMR, light scattering, and calorimetry // *Biophys. J.*– 1995.– Vol. 68, N2.– P. 584–597.
15. *Pegg D.E., Diaper M.P.* On the mechanism of injury to slowly frozen erythrocytes // *Biophys. J.*– 1998.– Vol. 54, N3.– P. 471–488.
16. *Repin N.V., Bobrova E.N., Repina S.V.* Thermally induced transformation of mammalian red blood cell during hyperthermia // *Bioelectrochemistry.*– 2008.– Vol. 73.– P. 101–105.
17. *Yawata Y.* Cell Membrane: the red blood cell as a model. Weinheim: WILEY – VCH Verlag GmbH &Co, 2003.– 448 p.

*Поступила 06.07.2010
Рецензент А.М. Компаниец*

Accepted in 06.07.2010