Национальная Академия наук Украины,
отделение молекулярной биологии, биохимии, экспериментальной и клинической физиологии

Институт проблем криобиологии и криомедицины

1

2001

ISSN 0233-7673

National Academy of Sciences of the Ukraine
Department of Molecular Biology, Biochemistry, Experimental and Clinical Physiology
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

1
2001

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

Бондаренко В. А., Коптелов В. А., Лежанин С. Н., Олейник О. А., Рамазанов В. В., Середа Т. П. Зависимость интенсивности транспорта флуоресцеина от температуры среды 3
Кулешова Л. Г., Орлова Н. В., Шпакова Н. М. Антигемолитическая и трансформирующая активность амфифильных соединений 8
Кравченко Л. П., Петренко А. Ю., Сомов А. Ю., Фуллер Б. Д. Дыхательная активность изолированных гепатоцитов при длительном холодовом хранении и последующей нормотермической инкубации 15
Родионова Н. Л., Белоус А. М., Рязанцев В. В., Петренко А. Ю. Изменение активности глутатионзависимых ферментов в ткани слизистой полости рта крыс при различных температурных воздействиях 20
Гордієнко Є. О., Гордієнко О. І., Васильченко Л. І., Коваленко І. Ф., Паніна Ю. Є. Проникність мембран еритроцитів донорської та пуповинної крові людини для молекул 1,2-пропандіолу і диметилсульфоксиду в діапазоні позитивних температур 25
Гордиенко Н. А., Безуглый Н. Д., Медведовский А. В., Жерноклев Г. В., Янгс К. Р. Некоторые биофизические свойства половых и эмбриональных клеток свиньи, определение их криорезистентности. III. Осмотический состав бластоцист свиньи 28
Бабийчук Л. А., Землянских Н. Г. Оптимизация и преимущества безотмывочного метода криоконсервирования эритроцитов с ПЭО-1500 35
Моисеева Н. Н., Мазур С. П., Оченашко О. В., Петренко А. Ю. Влияние трансплантации криоконсервированных клеток фетальной печени человека на регенерацию и функции печени крыс после частичной гепатэктомии 42

КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ БИООБЪЕКТОВ

Бондаренко Т. П., Луговой С. В. Влияние димексида на секретирующую способность тироцитов новорожденных поросят 48
Цуцаева А. А., Ананьина А. Е. Влияние условий хранения на свойства криоконсервированной и лиофилизированной культуры *Streptomyces fradiae* 25Ab12 52
Сандомирский Б. П., Гальченко С. Е., Гальченко Е. С. Влияние температуры и времени хранения на качество молозива коров 60

КРИОМЕДИЦИНА

Караченцев Ю. И., Лях И. А., Македонская В. А. Влияние аллотрансплантации криоконсервированной ткани щитовидной железы на гормональный и иммунный статус больных постоперационным гипотиреозом 65
Мошко Ю. А. Применение криоконсервированной сыворотки кордовой крови в лечении женщин с хроническими сальпингоофоритами 70
Питько В. А. Динамика биохимических показателей в плазме крови женщин с подострым сальпингоофоритом при трансплантации криоконсервированной хориальной ткани 76

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Мигунова Р. К., Тодрин А. Ф., Капрельянц А. С. Физико-математическая оценка времени замещения льда в замороженной ткани 80
Никишкова И. Н. Влияние предварительного общего умеренного охлаждения на динамику содержания биоэлементов в неокортексе и гиппокампе при обучении 3- и 6-месячных животных 82
Гулевский А. К., Грищенкова Е. А., Рязанцев В. В., Релина Л. И. Влияние холодовой акклимации на фосфолипидный состав личинок большого мучного хрущака *Tenebrio moltor* 84
Зинченко В. Д., Кадникова Н. Г., Ковальчук И. М., Грек А. М. Стерилизация оборудования для криобиологических технологий с помощью озона 86
Полевич В. В. Концепція розробки нового апарата для охолодження пива 88

str.,

© Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины, "Проблемы криобиологии", 2000

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

УДК 57.043: 612

UDC 57.043: 612

Зависимость интенсивности транспорта флуоресцеина от температуры среды

В. А. БОНДАРЕНКО, В. А. КОПТЕЛОВ, С. Н. ЛЕЖАНИН, О. А. ОЛЕЙНИК, В. В. РАМАЗАНОВ, Т. П. СЕРЕДА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Dependence of Fluorescein Transport Intensity on Medium Temperature

V. A. BONDARENKO, V. A. KOPTELOV, S. N. LEZHANIN, O. A. OLEJNIK, V. V. RAMAZANOV, T. P. SEREDA

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

Исследовано влияние температуры на вход в клетки различных типов (эритроциты и изолированные гепатоциты) флуоресцентного красителя флуоресцеина. Показана значительная зависимость интенсивности проникновения флуоресцеина сквозь плазматическую мембрану от температуры. Обнаружены качественные различия между процессом входа красителя в изолированных гепатоцитах и эритроцитах.

Досліджено вплив температури на вхід до клітин різних типів (ізольованих гепатоцитів та еритроцитів) флуоресцентної сполуки — флуоресцеїну. Показана значна залежність інтенсивності проникнення флуоресцеїна крізь плазматичну мембрану від температури. Виявлено якісні відмінності між процесом входу барвника в ізольованих гепатоцитах та еритроцитах.

The influence of temperature on the uptake of fluorescent dye — fluorescein in the cells of different types (erythrocytes and isolated hepatocytes) was investigated. A significant dependence of the intensity of fluorescein penetration through a plasm membrane on temperature was demonstrated. The qualitative differences between dye uptake process in isolated hepatocytes and erythrocytes were found.

В последнее время возрастает интерес к изучению транспорта органических анионов сквозь плазматическую мембрану [3, 6]. Одним из наиболее подходящих для этого объектов является флуоресцентный краситель — флуоресцеин с высоким квантовым выходом, что позволяет с большой точностью регистрировать его ничтожные (доли микромоля) концентрации.

Производные флуоресцеина находят применение в самых различных областях биологии. Флуоресцеиндиацетат — эфир, легко проникающий в клетку сквозь фосфолипидный бислой, внутри клетки гидролизуется эстеразами до свободного флуоресцеина, имеющего худшую проницаемость, что позволяет использовать его как маркер целостности плазматической мембраны. Наличие флуоресцеина в клетках можно регистрировать с помощью люминесцентного микроскопа [11] или флуоресцентного спектрофотометра [10]. Способность флуоресцеина и его производных образовывать подобные эфиры, а также присутствие в молекуле карбоксильной группы, конформация которой определяет наличие и интенсивность флуоресценции молекулы [2], позволяет использовать производное флуоресцеина (BCECF-AM) для измерения внутриклеточного *pH*. Другое производное флуо-

Recently there is an increase in the interest for studying the transport of organic anions through a plasm membrane [3, 6]. Fluorescent dye — fluorescein with a high quantum release is one of the most convenient ones for this object, that allows to record with a high accuracy its insignificant (micromole fractions) concentrations.

Fluorescein derivatives find their application in various fields of biology. Fluorescein diacetate is the ether, easily penetrating into a cell through a phospholipid bilayer, that is hydrolyzed by esterases inside of a cell up to free fluorescein, which has a worse permeability, that permits to use it as a marker of plasmatic membrane integrity. The fluorescein presence in cells can be registered by means of luminescent microscope [11] or fluorescent spectrophotometer [10]. The capability of fluorescein and its derivatives to form the similar ethers, as well as the presence in a molecule of carboxyl group, which conformation determines the presence and the intensity of the molecule fluorescence [2], allows to use the fluorescein derivative (BCECF-AM) for intracellular *pH* measuring. Another fluorescein derivative (FITC) is applied for labelling proteins, for example antibodies.

Physical and chemical properties of fluorescein allow to use it as a substrate for organic anion trans-

ресцеина (FITC) применяется для мечения белков, например антител.

Физико-химические свойства флуоресцеина позволяют использовать его как субстрат для транспортной системы органических анионов, которая сильно развита в печени и транспортных эпителиях. Важной функцией печени является удаление из организма различных производных метаболизма, лекарств, токсинов и других ксенобиотиков путем экскреции их конъюгатов в желчь. Для этой цели в мембранах гепатоцитов имеются специфические белки – Oatp [7] и Mrp2 [9]. Оба этих транспортера обладают широкой субстратной специфичностью и имеют максимальное сродство к отрицательно заряженным молекулам с молекулярной массой больше 250 дальтон [8]. Тот факт, что молекула флуоресцеина соответствует этим критериям, позволяет предположить, что транспорт этого вещества осуществляется с помощью одного или обоих вышеуказанных белков. Все это дает возможность рассматривать транспорт флуоресцеина как структурно-функциональный показатель состояния клетки в различных экспериментальных условиях.

Однако предположение об участии Oatp и Mrp2 в транспорте флуоресцеина может оказаться целиком или частично ошибочным. Так, Персидским и Бэйли [10] был показан транспорт флуоресцеина в миелокариоцитах, не несущих функции секреции органических анионов. Ввиду этого необходимо исследовать данный процесс применительно к другим подобным объектам, например эритроцитам.

Одной из важнейших областей криобиологии является изучение влияния гипотермии на биологические объекты. Так, гипотермическое хранение пока что единственный метод хранения органов. В связи с этим необходимо изучить процессы, происходящие в них, на разных моделях (например, срезы ткани, изолированные и культивируемые гепатоциты) в условиях различной степени гипотермии.

Цель работы – исследовать зависимость проницаемости для флуоресцеина плазматических мембран эритроцитов человека и изолированных гепатоцитов крыс от температуры.

В работе использовали эритроциты, полученные из донорской крови II группы.

Изолированные гепатоциты выделяли ферментативным способом (с помощью коллагеназы), описанном в [5]. В эксперименте использовали крыс линии Вистар обоего пола 6–12 мес. Животное наркотизировали тиопенталом натрия, после чего вскрывали брюшную полость. В воротную вену вставляли канюлю диаметром 1 мм и закрепляли лигатурой, надсекали нижнюю полую вену и перфузировали в течение 10–15 мин при температуре 37 °С буферным раствором следующего состава (ммоль): NaCl – 160, KCl – 3,15, Na_2HPO_4 – 6,7, HEPES – 0,33; *pH* – 7,65. После этого печень удаляли из брюшной полости, зажимом передавливали верхнюю полую вену и рециркуляторно перport system, that is well developed in a liver and transport epithelia. One of the important liver functions is the removal from an organism of different derivatives of metabolism, medicines, toxins and other xenobiotics by means of their conjugates excretion in a bile. For this purpose in the membranes of hepatocytes there are Oatp [7] and Mrp2 [9] specific proteins. Both these transporters possess a wide substrate specificity and have a minimum affinity to negatively charged molecules with a higher than 250 Da molecular mass [8]. The fact that fluorescein molecule corresponds to these criteria allows to suppose, that this substance transport is realized by means of one or both the mentioned above proteins. All this gives the possibility to consider the fluorescein transport as a structural and functional index of a cell state under various experimental conditions.

However the supposition about Mrp2 and Oatp participation in fluorescein transport can occur to be completely or partially erroneous. So Persidsky and Baillie [10] demonstrated fluorescein transport in myelokariocytes, that had not the function of organic anion secretion. Due to this fact it is indispensable to investigate this process in respect to other similar objects, for example erythrocytes.

One of the most important fields of cryobiology is the study of hypothermia effect on biological objects. So, hypothermic storage is the unique method of organs' preservation. In this connection it is expedient to study the processes, occurring in them, in various models (for examples, tissue slices, isolated and cultured hepatocytes) under hypothermia conditions of different degree.

The aim of this work was to investigate the permeability dependence for fluorescein of plasmatic membranes of human erythrocytes and rat's isolated hepatocytes on the temperature.

The erythrocytes, obtained from a donor blood of the IInd group, were used in the work.

Isolated hepatocytes were obtained using an enzymatic way (by means of collagenase), described in the [5]. Wistar line rats of both sexes of 6–12 months were used in the experiment. An animal was narcotized by sodium thiopental, then an abdominal cavity was opened. A 1 mm diameter cannula was placed into a portal vein and fixed by ligature, vena cava inferior was cut and perfused within 15–20 min at the temperature of 37 °C by buffer solution of following composition (mM): NaCl – 160, KCl – 3.15, Na_2HPO_4 – 6.7, HEPES – 0.33; *pH* – 7.65. Then liver was removed from abdominal cavity, a vena cava superior was pinched by a clamp and recirculatorilly perfused during 15–20 min by the same solution, containing additionally 0.075% of $CaCl_2$ and 0.05% of collagenase.

Liver dispersion was carried-out by means of forcing through nylon in cooled Hanks solution. After being filtrated the tubes with cellular suspension were thawed at the temperature of 0 °C during 20 min.

фузировали в течение 15–20 мин тем же раствором, содержащим дополнительно 0,075% $CaCl_2$ и 0,05% коллагеназы.

Диспергирование печени осуществляли продавливанием сквозь нейлон в охлажденном растворе Хенкса. После фильтрования пробирки с клеточной суспензией отстаивали при температуре 0 °С в течение 20 мин.

Затем суспензию центрифугировали в течение 3 мин при 50*g*, надосадок удаляли и дважды центрифугировали при тех же условиях в течение 1 мин для очистки суспензии. Экспресс-оценку клеточной суспензии проводили с помощью трипанового синего [4]. Жизнеспособность выделенных клеток составляла 85–90%, количество $(250–350)\cdot10^6$ клеток на 5–7 г сырого веса печени.

Для эритроцитов использовали изоосмотическую среду, содержащую 150 ммоль NaCl. Эритроциты инкубировали в данной среде в течение 1, 2, 5, 10 и 15 мин при температурах 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 35, 37 и 40 °С с флуоресцеином (20 мкмоль). Осадок эритроцитов, нагруженных флуоресцеином, лизировали дистиллятом на льду в течение 5 мин, гемоглобин осаждали на льду 5 мин трихлоруксусной кислотой в конечной концентрации 3,3%, центрифугировали, *pH* надосадочной жидкости доводили до 12 и измеряли интенсивность флуоресценции (см. ниже).

Среду инкубации для изолированных гепатоцитов готовили следующим образом: к 3 мл раствора Хенкса добавляли маточный раствор флуоресцеина до конечной концентрации 100 мкмоль, после чего пробирки со средой помещали в баню с соответствующей температурой (0, 25 и 37 °С) и выдерживали 10 мин. Затем в пробирки добавляли клетки из расчета $0{,}75\cdot10^6$ клеток на 1 мл среды, после чего пробы инкубировали в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 и 20 мин. По истечении времени инкубации пробы отмывали тремя объемами холодного раствора Хенкса, заливали 3 мл этого же раствора, добавляли 100 мкмоль 20%-го раствора Тритона Х-100 и инкубировали 20 мин до полного разрушения клеток. Флуоресценцию измеряли при помощи флуоресцентного спектрофотометра "Hitachi MPF-2a" при длине волны возбуждения 486 нм, максимуме длины волны эмиссии 517 нм [1].

На рис. 1 и 2 представлены зависимости входа флуоресцеина в эритроциты от температуры среды инкубации. Начиная с 15 °С, проницаемость мембраны для флуоресцеина резко возрастает с увеличением температуры. Кривые имеют характер, близкий к экспоненциальному, однако после достижения максимума, приблизительно к 10-й минуте, наблюдается тенденция к снижению количества флуоресцеина, аккумулировавшегося в клетках. На рис. 3 показаны аналогичные зависимости для изолированных гепатоцитов. Характер кривых сходен с таковым для эритроцитов. С ростом температуры интенсивность входа вещества

Then the suspension was centrifuged within 3 min at 50*g*, the supernatant was removed and twice centrifuged under the same conditions during 1 min for the suspension clearing. The express-evaluation of cell suspension was accomplished by means of trypane blue [4]. The viability of isolated cells made 85–90%, the number $(250–350)\cdot10^6$ per 5–7 g of liver raw weigh.

An isoosmotic medium, containing 150 mM of NaCl was used for erythrocytes. Erythrocytes were incubated in the given medium during 1, 2, 5, 10 and 15 min at the temperatures of 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 35, 37 and 40 °C with fluorescein (20 μM). The sediment of fuorescein-loaded erythrocytes was lysed by a distillate on ice during 5 min, haemoglobin was precipitated on the ice within 5 min by means of trichloroacetic acid under final concentration of 3.3%, centrifuged, pH of supernatant fluid was approached to 12 and the fluorescence intensity was measured (see below).

The incubation medium for isolated hepatocytes was prepared by such a way: to 3 ml of Hanks solution we added the stock solution of fluorescein up to a final concentration of 100 μM, after that the glasses with the medium were placed in a bath with the corresponding temperature (0, 25 and 37 °C) and kept during 10 min. Then the cells were added in to the glasses at a rate of $0.75\cdot10^6$ of cells per 1 ml of medium, after that the trials were incubated during 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 and 20 min. After the incubation time ceasing the trials were washed-out by three volumes of cold Hanks solution, one filled in 3 ml of the same solution, added 100 μM of a 20% Triton X-100 solution and incubated 20 min till a complete cell destruction. Fluorescence was measured with "Hitachi MPF-2a" spectrophotometer at the excitation wave-

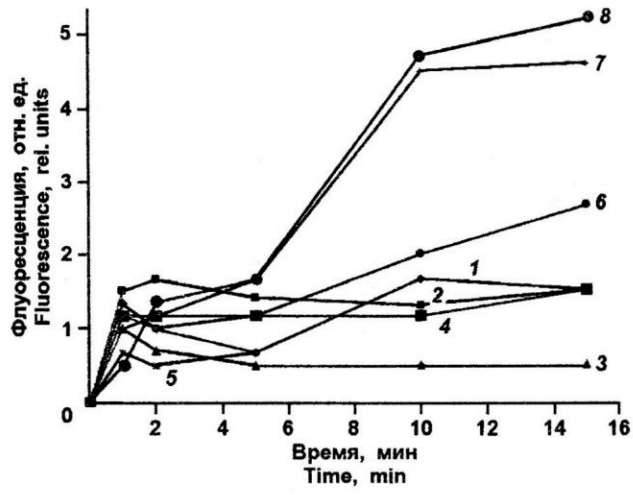

Рис. 1. Зависимость входа флуоресцеина в эритроциты человека от температуры среды инкубации, °С: *1* – 0; *2* – 3; *3* – 6; *4* – 9; *5* – 12; *6* – 15; *7* – 18; *8* – 21.

Fig. 1. Dependence of fluorescein uptake into human erythrocytes on the temperature of incubation medium, °C: *1* – 0; *2* – 3; *3* – 6; *4* – 9; *5* – 12; *6* – 15; *7* – 18; *8* – 21.

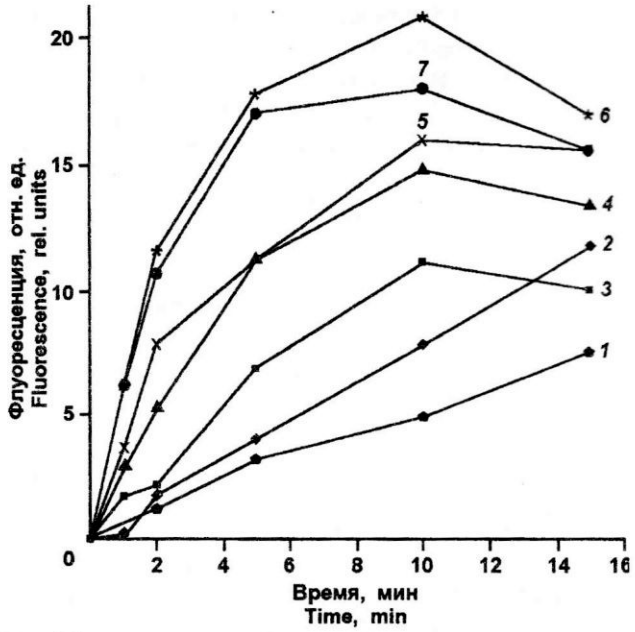

Рис. 2. Зависимость входа флуоресцеина в эритроциты человека от температуры среды инкубации, °С: *1* – 24; *2* – 27; *3* – 30; *4* – 33; *5* – 36; *6* – 39; *7* – 42.

Fig. 2. Dependence of fluorescein uptake into human erythrocytes on the temperature of incubation medium: *1* – 24; *2* – 27; *3* – 30; *4* – 33; *5* – 36; *6* – 39; *7* – 42.

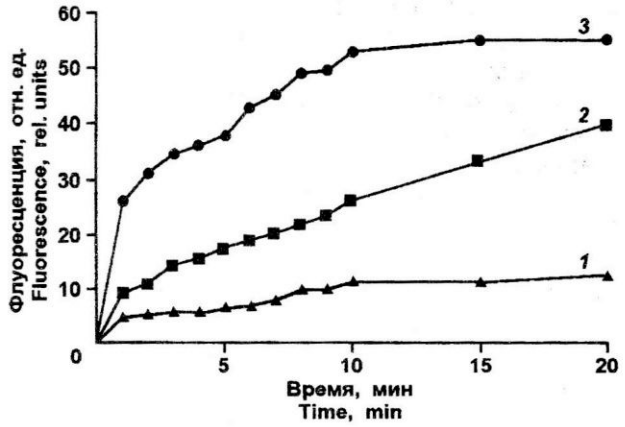

Рис. 3. Зависимость входа флуоресцеина в изолированные гепатоциты крыс от температуры среды инкубации, °С: *1* – 0; *2* – 20; *3* – 37.

Fig. 3. Dependence of fluorescein uptake into rats' isolated hepatocytes on the temperature of incubation medium: *1* – 0; *2* – 20; *3* – 37.

резко возрастает, однако снижения количества флуоресцеина после достижения максимума не наблюдается.

Сопоставляя результаты, полученные на различных типах клеток, можно сделать некоторые обобщения. Повышение скорости входа флуоресцеина с ростом температуры характерно для обоих исследуемых типов клеток. При физиологической температуре максимум достигается одинаково в обоих случаях к 10-й минуте инкубации. Чрезвычайно сильное различие между скоростью входа флуоресцеина при 0 и 37 °С позволяет сделать вывод, что флуоресцеин проникает в клетки с помощью канала либо переносчика. Гипотеза об активном транспорте, высказанная в [10], маловероятна ввиду способности флуоресцеина как проникать внутрь клетки, так и выходить из нее, причем с сопоставимой скоростью.

Наиболее труднообъяснимым является факт уменьшения аккумуляции флуоресцеина после достижения максимума для эритроцитов. Имеются данные для культивируемых гепатоцитов крыс с подобным явлением. Однако в этом случае снижение количества аккумулированного флуоресцеина наблюдается спустя длительное время после достижения максимума (порядка 60 мин). Кроме того, условия указанного эксперимента позволяют обнаружить, что флуоресцеин не покинул клетки, а просто "исчез", что скорее всего объясняется его деградацией под действием, возможно, микросомальной системы окисления гепатоцитов. К сожалению, для эритроцитов такое объяснение неприменимо ввиду малого промежутка между выходом

length of 486 nm, the maximum of emission wavelength was 517 nm [1].

The dependencies of fluorescein uptake into erythrocytes on the temperature of incubation medium are presented in Figs. 1 and 2. Beginning from 15 °C the membrane permeability for fluorescein sharply increases with temperature augmentation. The curves have the character close to an exponential one, however after reaching the maximum, approximately by the 10th minute, the tendency to a decrease in fluorescein number, being accumulated in cells, is observed. The analogous dependencies for isolated hepatocytes are demonstrated in Fig. 3. The character of curves is similar to those for erythrocytes. With an increase in temperature the intensity of substance uptake sharply augments, but a reduction of fluorescein number after reaching maximum is not observed.

Comparing the results, obtained in different types of cells, we can make some general conclusions. An increase in the rate of fluorescein uptake with the temperature augmentation is characteristic for both investigated types of cells. At a physiological temperature the maximum is reached by a similar way in both cases by the 10th minute of incubation. An extremely high difference between the rate of fluorescein uptake at 0 and 37 °C allows to conclude that fluorescein penetrates into cells via a channel or carrier. The hypothesis on an active transport, made in the [10] is hardly probable due to the capability of fluorescein both to penetrate inside of a cell and to leave it with a comparable rate.

The most hardly explained is the fact of reduction of fluorescein accumulation after reaching the maximum for erythrocytes. There are the data for cultured rat's hepatocytes with the similar phenomenon. However in this case a decrease in an accumulated fluorescein number is seen after a long time after the maximum attaining (about 60 min). Besides, the conditions of the mentioned experiment permit to reveal that fluorescein did not leave the cells, but simply

соответствующей кривой на плато и отсутствия интенсивного микросомального окисления.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Добрецов Г. Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании клеточных мембран и липопротеидов.– М.: Наука, 1989.– 172 с.
2. *Коган И. М.* Химия красителей.– М.: Госхимиздат, 1956.– 298 с.
3. *Ballatory N., Boyer J. L.* Taurine transport in skate hepatocytes I. Uptake and efflux // Am. J. Physiol. (Gastrointest. Liver Physiol. 25).– 1992.– 262.– P. G445–G450.
4. *Baur H., Kasperek S., Pfaff E.* Criteria of viability of isolated liver cells // Hoppe-Seyler Ztschr. Physiol. Chem.– 1975.– 356.– P. 827–838.
5. *Guillouzo A., Guguen-Guillouzo C.* Research in Isolated and Cultured Hepatocytes.– London–Paris: Les Editions INSERM, 1986.– 408 p.
6. *Klein M., Martinoia E., Weissenbock G.* Transport of lucifer yellow CH into plant vacuoles: evidence for direct energization of a sulphonated substance and implications for the design of new molecular probes // FEBS Lett.– 1997.– 420.– P. 86–92.
7. *Meier P. J., Eckhardt U., Schoeder A.* Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver // Hepatology.– 1997.– 26.– P. 1667–1677.
8. *Muller M., Jansen P. L. M.* Molecular aspects of hepatobiliary transport // Am. J. Physiol. (Gastrointest. Liver Physiol. 35).– 1997.– 272.– P. G1285–G1303.
9. *Paulusma C. C., Bosnia P. J., Zaman G. J. R. et al.* Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene // Science.– 1996.– 271.– P. 1126–1128.
10. *Persisdsky M. D., Baillie G. S.* Fluorometric test of cell membrane integrity // Cryobiology.– 1977.– 14, № 3.– P. 322–332.
11. *Rotman B., Papermaster B. W.* Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.– 1966.– 55.– P. 134–141.

Поступила 11.07.2000

"disappeared", that is rather explained by its degradation under the effect, apparently, of microsomal system of hepatocyte oxidation. Unfortunately, for erythrocytes such an explanation is not applicable due to a small interval between the outlet of a corresponding curve to the plateau and the absence of intensive microsomal oxidation.

REFERENCES

1. *Dobretsov G. E.* Fluorescent probes in the investigation of cellular membranes and lipoproteids.– M.: Nauka, 1989.– 172 p.
2. *Kogan I. M.* Chemistry of dyes.– M.: Goschimizdat, 1956.– 298 p.
3. *Ballatory N., Boyer J. L.* Taurine transport in skate hepatocytes I. Uptake and efflux // Am. J. Physiol. (Gastrointest. Liver Physiol. 25).– 1992.– 262.– P. G445–G450.
4. *Baur H., Kasperek S., Pfaff E.* Criteria of viability of isolated liver cells // Hoppe-Seyler Ztschr. Physiol. Chem.– 1975.– 356.– P. 827–838.
5. *Guillouzo A., Guguen-Guillouzo C.* Research in Isolated and Cultured Hepatocytes.– London–Paris: Les Editions INSERM, 1986.– 408 p.
6. *Klein M., Martinoia E., Weissenbock G.* Transport of lucifer yellow CH into plant vacuoles: evidence for direct energization of a sulphonated substance and implications for the design of new molecular probes // FEBS Lett.– 1997.– 420.– P. 86–92.
7. *Meier P. J., Eckhardt U., Schoeder A.* Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver // Hepatology.– 1997.– 26.– P. 1667–1677.
8. *Muller M., Jansen P. L. M.* Molecular aspects of hepatobiliary transport // Am. J. Physiol. (Gastrointest. Liver Physiol. 35).– 1997.– 272.– P. G1285–G1303.
9. *Paulusma C. C., Bosnia P. J., Zaman G. J. R. et al.* Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene // Science.– 1996.– 271.– P. 1126–1128.
10. *Persisdsky M. D., Baillie G. S.* Fluorometric test of cell membrane integrity // Cryobiology.– 1977.– 14, № 3.– P. 322–332.
11. *Rotman B., Papermaster B. W.* Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.– 1966.– 55.– P. 134–141.

Accepted in 11.07.2000