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

УДК 577.1: 57.043: 611-018.51

UDC 577.1: 57.043: 611-018.51

Антигемолитическая и трансформирующая активность амфифильных соединений

Л. Г. КУЛЕШОВА, Н. В. ОРЛОВА, Н. М. ШПАКОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Antihemolytic and Transforming Activity of Amphiphilic Compounds

L. G. KULESHOVA, N. V. ORLOVA, N. M. SHPAKOVA

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

Проведен морфологический анализ эритроцитов, находящихся в физиологическом растворе и плазме, в присутствии катионных, анионных, неионных и цвиттерионных амфифильных соединений. Несмотря на то, что морфологический ответ клеток на введение в среду амфифильных соединений различен, все исследуемые вещества проявляли высокую антигемолитическую активность (60–90%) в условиях гипертонического стресса эритроцитов.

Проведено морфологічний аналіз еритроцитів, що знаходилися у фізіологічному розчині та плазмі, в присутності катіонних, аніонних, неіонних та цвіттеріонних амфіфільних сполук. Незважаючи на те, що морфологічна відповідь клітин на введення в середовище амфіфільних сполук була різною, усі речовини, що досліджувалися, виявляли високу антигемолітичну активність (60–90%) в умовах гіпертонічного стресу еритроцитів.

Morphological analysis of the erythrocytes, being in a physiological solution and in plasm, in the presence of cationic, anionic, non-ionic and zwitterionic amphiphilic compounds has been conducted. In spite of the fact, that cell morphological response to the introduction of amphiphilic compounds into the medium varies, all studied substances manifested a high antihemolytic activity (60–90%) under hypertonic stress of erythrocytes.

Эритроциты человека при перенесении в среду, содержащую хлорид натрия в концентрации 2,6 М и выше, лизируют. Лизис клеток в растворе 4,0 М NaCl развивается в течение 2 мин и достигает уровня 90%. Предварительная обработка клеток глюкозой либо их частичная дегидратация позволяет снизить уровень гипертонического повреждения [2]. Нами показано, что гипертонический лизис существенно уменьшается и в том случае, когда в растворе 4,0 М NaCl в момент внесения клеток находятся катионные или неионные амфипатические соединения [3, 4].

Цель данной работы – изучить действие некоторых амфипатических соединений на устойчивость эритроцитов к гипертоническому стрессу и исследовать изменения формы клеток, индуцированные этими веществами. Для изучения антигемолитической активности и трансформирующей способности были выбраны представители анионных (децилсульфат натрия), катионных (хлорпромазин), неионных (додецил-β,D-мальтозид) и цвиттерионных (3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфонат) амфифильных соединений.

Эритроциты получали из донорской крови II группы. После удаления плазмы эритромассу дважды отмывали физиологическим раствором (0,15 М NaCl, 0,01 М фосфатный буфер, *pH* 7,4) и хранили в виде плотного осадка не более 2 ч при 0 °С. Все используемые в работе среды готовили на 0,01 М фосфатном буфере, *pH* 7,4.

There is human erythrocytes lysis when transferring into the medium, containing sodium chloride in 2.6 M concentration and higher. Cell lysis in 4.0 M NaCl solution develops within 2 min and reaches the level of 90%. Preliminary cell treatment by glucose or their partial dehydration allows to reduce the level of hypertonic impairment [2]. We demonstrated, that hypertonic lysis significantly decreased in the case, when cationic and non-ionic amphipatic compounds were in 4.0 M NaCl solution to the moment of cell introduction [3, 4].

The aim of given work was to study the effect of some amphipatic compounds on erythrocytes' stability to hypertonic stress and investigate the changes of cell shape, induced by these substances. derivatives of anionic (sodium decyl sulphate), cationic (chlorpromazine), non-ionic (dodecyl-β,D-maltoside) and zwitterionic (3-cetyldimethylammonium-1-propane sulphonate) amphiphilic compounds were chosen for studying antihemolytic activity and transforming capability.

Erythrocytes were obtained from the II-nd donor's group. After plasm removal the erythromass was twice washed-out by physiological solution (0.15 M NaCl, 0.01 M phosphate buffer, *pH* 7.4) and stored as a dense sediment not more than 2 hrs under 0 °C. All used in the work media were prepared by 0.01 M phosphate buffer, *pH* 7.4.

Hyperosmotic shock was induced by transferring erythrocytes into 4.0 M NaCl solution under given

Гиперосмотический шок осуществляли путем перенесения эритроцитов в раствор 4,0 М NaCl при заданной температуре на 5 мин. Конечный гематокрит составлял 0,4%. Степень гемолиза определяли спектрофотометрически (543 нм), измеряя гемоглобин в супернатанте. Антигемолитическую активность амфифильных соединений выражали как процент снижения гемолиза по сравнению с пробой, не содержащей амфифил.

Морфологический анализ эритроцитов проводили методом световой микроскопии на микроскопе МБИ-15У с фотографической регистрацией морфологической картины крови. Реакцию клеток на введение амфифильных соединений оценивали в микропробе капли крови, которую помещали между двумя покровными стеклами и равномерно распределяли тонким слоем. При этом эритроциты находились во взвешенном состоянии, что позволяло всесторонне наблюдать за формой клетки, начиная с 30-й секунды реакции [1]. В морфологической оценке особенностей формы и поверхностной архитектоники эритроцитов применяли общепринятую классификацию, приведенную в [5].

В работе были использованы хлорпромазин (Serva), 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфонат и додецил-β,D-мальтозид (Calbiochem), децилсульфат натрия (НИИПАВ), реактивы отечественного производства квалификации х.ч. и ч.д.а.

Исследуемые соединения различны по своей химической структуре. Хлорпромазин, который является катионным амфифильным соединением, — производное фенотиазина. Класс анионных соединений представлен децилсульфатом натрия. Додецил-β,D-мальтозид и 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфонат относятся к неионным и цвиттерионным амфифилам.

В таблице приведены концентрации амфифильных соединений, обеспечивающие максимальную защиту эритроцитов от гипертонического лизиса, и величины максимальной антигемолитической активности амфифилов. Из представленных данных видно, что в условиях гипертонического шока эритроцитов все исследуемые вещества при температуре 37 °С обладают антигемолитической активностью. Хлорпромазин и децилсульфат натрия характеризуются высоким уровнем антигемолитической активности — 80–90%, в то время как протектирующий эффект додецил-β,D-мальтозида и 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфоната выражен в меньшей степени (около 60%). Эффективные концентрации исследуемых амфипатических соединений — это концентрации, при которых гипертонический гемолиз эритроцитов минимален, а антигемолитическая активность этих веществ — максимальна.

Следует обратить внимание, что эффективные концентрации веществ, оказывающие наиболее выраженный протектирующий эффект (хлорпромазин и децилсульфат), на 1–2 порядка выше по

temperature for 5 min. Final hematocrit made 0.4%. Hemolysis degree was detected spectrophotometrically (543 nm) by measuring hemoglobin in a supernatant. Antihemolytic activity of amphiphilic compounds was manifested as a percentage of hemolysis reduction in comparison with a sample, not containing amphiphile.

Morphological analysis of erythrocytes was carried-out by the method of light microscopy on MBI-15U microscope with photographing registration of blood morphological picture. Cell response to the introduction of amphiphilic compounds was estimated in a microprobe of blood drop, placed between two cover glasses and evenly redistributed by a thin layer. Thereat erythrocytes were in a suspended state, that allowed to observe comprehensively the cell shape, starting from the 30th second reaction [1]. In morphological estimation of shape peculiarities and surficial architecture of erythrocytes, generally accepted classification, given in the work [5] was applied.

Chlorpromazine (Serva), 3-cetyldimethylammonium-1-propane sulphonate and dodecyl-β,D-maltoside (Calbiochem), sodium decylsulphate, reagents of home productionof chemically pure and pure for analysis qualification.

Studied compounds differed on their chemical structure. Chlorpromazine, being cationic amphiphilic compound, is phenotiasine derivative. Class of anionic compounds is represented by sodium decylsulphate. Dodecyl-β,D-maltoside and 3-cetyldimethylammonium-1-propane sulphonate are related to nonionic and zwitterionic amphiphiles.

Concentrations of amphiphilic compounds, providing maximum erythrocytes protection from hypertonic lysis and the values of maximum antihemolytic activity of amphiphiles are presented in the table. As it is seen from the data presented, under the conditions of erythrocytes hypertonic shock all studied substances at 37 °C possess antihemolytic activity. Chlorpromazine and sodium decylsulphate are characterized by a high level of antihemolytic activity — 80–90%, at the same time protecting effect of dodecyl-β,D-maltoside and 3-cetyldimethylammonium-1-propane sulphonate is manifested less (about 60%). Efficient concentrations of studied amphipatic compounds these are concentrations, under which a hypertonic effect of erythrocytes is minimum and antihemolytic activity of these substances is maximum.

Efficient concentrations and values of maximum antihemolytic activity in amphiphilic compounds under the conditions of erythrocytes hypertonic stress (4.0 M NaCl, 37 °C)

Substance	Efficient concentrations, μM	Antihemolytic activity, %
Sodium decylsulphate	40	84 ± 5
Chlorpromazine	120	93 ± 7
Dodecyl-β,D-maltoside	6	67 ± 9
3-cetyldimethylammonium-1-propane sulphonate	6	60 ± 7

сравнению с менее активными соединениями (додецил-β,D-мальтозид и 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфонат).

Эффективные концентрации и величины максимальной антигемолитической активности амфифильных соединений в условиях гипертонического стресса эритроцитов (4,0 М NaCl, температура 37 °С)

Вещество	Эффективные концентрации, мкМ	Антигемолитическая активность, %
Децилсульфат натрия	40	84 ± 5
Хлорпромазин	120	93 ± 7
Додецил-β,D-мальтозид	6	67 ± 9
3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфонат	6	60 ± 7

Общим для молекул всех изучаемых соединений является их амфифильность, обусловленная наличием в молекуле как гидрофобной, так и гидрофильной частей. Именно эта характерная особенность позволяет молекулам веществ проникать в мембрану и распределяться в ней. Об особенностях распределения свидетельствует морфологический анализ клеток, обработанных амфифильными соединениями.

На рис. 1, *а* даны контрольные эритроциты, находящиеся в физиологическом растворе, в котором большинство клеток имели слабо выраженную эхиноцитарную форму. Кренированные эритроциты представлены главным образом эхиноцитами I и II по классификации Bessis [5]. Так как отмеченный эхиноцитоз наблюдался и в том случае, когда использовали силиконизированные предметные и покровные стекла, мы полагаем, что он не обусловлен "эффектом стекла". Кренирование клеток, по-видимому, является результатом удаления белков плазмы, в частности альбумина [7], при отмывании эритроцитов физиологическим раствором.

Таким образом, предварительный морфологический анализ эритроцитов показал, что последующие исследования клеток в физиологическом растворе с использованием амфифильных соединений

It should be noted, that efficient concentrations of substances, causing the most manifested protecting effect (chlorpromazine and decylsulphate), by 1–2 times higher in comparison with less active compounds (dodecyl-β,D-maltoside and 3-cetyldimethylammonium-1-propane sulphonate).

Amphiphilic characteristic, stipulated by the presence of both hydrophobic and hydrophilic parts in molecule is common for all studied compounds. This characteristic allows for molecules of substances to penetrate into a membrane and redistribute in it. Morphological analysis of cells, treated by amphiphilic compounds, testifies to redistribution peculiarities.

The control erythrocytes in a physiological solution, where the majority of cells has slightly manifested echinocyte shape are presented in Fig. 1, *а*. Crenated erythrocytes are manifested, mainly, by I and II types of echinocytes according to Bessis classification [5]. Echinocytosis was observed in the case, when siliconized subject and cover glasses were used in the work, thus we suppose, that it was not stipulated by a "glass effect". Cell crenation, obviously, is the result of the removal of plasm proteins, in particular, albumin [7], when washing-out the erythrocytes by a physiological solution.

Thus, preliminary morphological analysis of erythrocytes demonstrated that further cell investigations in physiological solution using amphiphilic compounds were conducted in initially crenated erythrocytes. Erythrocytes' morphological response on the introduction into physiological solution of different amphiphilic compounds is presented by microphotos (Fig. 2).

Under the effect of positively charged chlorpromazine the change of the cell shape occurred. In this case the majority of erythrocytes in the sample was manifested by stomatocytes and spherostomatocytes. Another picture was observed when using sodium decylsulphate, dodecyl-β,D-maltoside and 3-cetyldimethylammonium-1-propane sulphonate. Cell response to the introduction of anionic and non-ionic

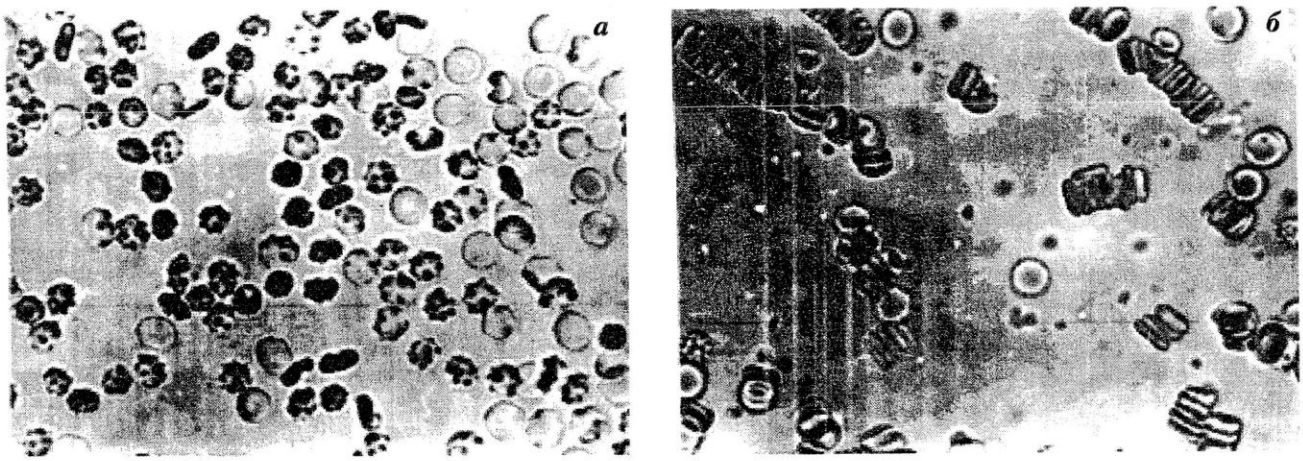


Рис. 1. Морфоэритрограмма донорской крови человека: *а* — эритроциты в физиологическом растворе; *б* — эритроциты в плазме.

Fig. 1. Morphoerythrogram of human donor's blood: *а* — erythrocytes in physiological solution; *б* — erythrocytes in plasm.

проводили на исходно кренированных эритроцитах. Морфологический ответ эритроцитов на введение в физиологический раствор различных амфифильных соединений представлен микрофотографиями (рис. 2).

Под влиянием положительно заряженного хлорпромазина происходило изменение формы клеток. В этом случае большинство эритроцитов в образце представлено стоматоцитами и сферостоматоцитами. Иная картина наблюдалась при использовании децилсульфата натрия, додецил-β,D-мальтозида и 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфоната. Реакция клеток на введение в среду анионного или неионного соединения сопровождалась образованием сфероэхиноцитов, а в присутствии 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфоната в образце были сферы и отдельные эхиноцитарные клетки.

Наблюдаемые морфологические особенности эритроцитов в присутствии амфифильных веществ не зависели от времени инкубации клеток (до 30 мин).

Так как вышеописанные результаты были получены на исходно кренированных клетках, мы провели морфологический анализ эритроцитов, нахо-

compound into the medium was accompanied by spheroechinocytes formation, and in the presence of 3-cetyldimethylammonium-1-propane sulphonate in the sample the spheres and separate echinocyte cells were observed.

Observed morphological peculiarities of erythrocytes in the presence of amphiphile compounds did not depend on the time of cell incubation (up to 30 min).

We have conducted morphological analysis of erythrocytes, being in a plasm, because the results, described were obtained in the initially crenated cells (Fig. 1, *b*). As it is seen, erythrocytes of the whole blood are of discocyte shape. In the vision field the columns of grouped erythrocytes are seen.

Erythrocytes of the whole blood in the presence of amphiphilic compound are presented on the Fig. 3. It is seen, that in this case the transformation of cells is observed only when using chlorpromazine and of 3-cetyldimethylammonium-1-propane sulphonate in the concentrations, higher, than in the experiments with washed-out erythrocytes. Chlorpromazine causes the appearance of stomatocytes in plasm, meanwhile 3-ce-

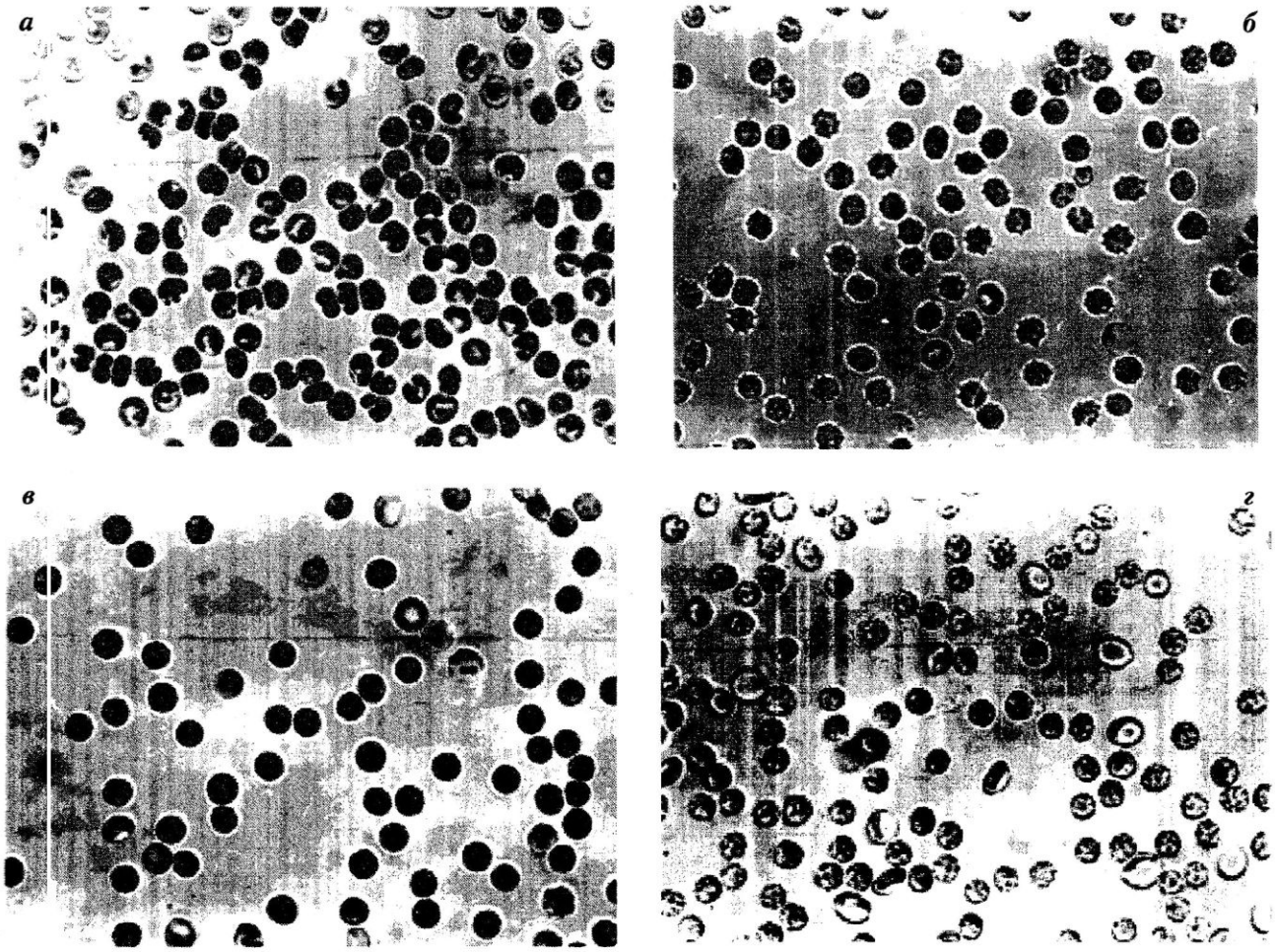


Рис. 2. Реакция отмытых эритроцитов на введение амфифильных соединений: *а* – хлорпромазина (160 мкМ); *б* – децилсульфата натрия (40 мкМ); *в* – 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфоната (8 мкМ); *г* – додецил-β,D-мальтозида (12 мкМ).

Fig. 2. Response of washed-out erythrocytes to the introduction of amphiphilic compounds: *а* – chlorpromazine (160 μM); *б* – sodium decylsulphate (40 μM); *в* – 3-cetyldimethylammonium-1-propane sulphonate (8 μM); *г* – dodecyl-β,D-maltoside (12 μM).

дящихся в плазме (рис. 1, *б*). Видно, что эритроциты цельной крови имеют дискоцитарную форму. В поле зрения хорошо видны монетные столбики эритроцитов.

На рис. 3 представлены эритроциты цельной крови в присутствии амфифильных соединений. Видно, что в этом случае трансформация клеток наблюдается только при использовании хлорпромазина и 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфоната в концентрациях более высоких, чем в экспериментах с отмытыми эритроцитами. Хлорпромазин вызывает появление в плазме стоматоцитов, в то время как 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфонат – сфероэхиноцитов.

При добавлении к цельной крови как децилсульфата натрия, так и додецилмальтозида существенных морфологических изменений эритроцитов не выявлено. Клетки сохраняют способность к формированию монетных столбиков. В образцах отмечено незначительное увеличение количества эхиноцитарных клеток по сравнению с контролем, хотя концентрации веществ были в 8–9 раз больше, чем при исследовании формы эритроцитов в физиологическом растворе.

tyldimethylammonium-1-propane sulphonate – of spheroechinocytes.

When adding both sodium decylsulphate and dodecyl maltoside to the whole blood, no significant morphological changes in erythrocytes were revealed. The cells keep a capability to the formation of grouped erythrocytes columns. A slight increase in the number of echinocyte cells in comparison with the control was noted in the samples, though the concentrations of substances were by 8–9 times higher, than when investigating erythrocytes' shape in physiological solution.

Thus, erythrocyte response to the introduction of amphiphilic compounds is determined by the medium with the cells. In a physiological solution, when the control cells were initially crenated, all studied compounds possess transforming activity. When using erythrocytes of the whole blood just cationic and zwitterionic compounds caused the changes in a cell shape.

Cell transformation is stipulated by the building-in of the substances into membrane. It should be supposed, that the molecules of these compounds were unreachable for membrane, because in the presence of dodecylmaltoside and decyl alkyl sodium sulphate erythrocytes, being in a plasm, remained to be disco-

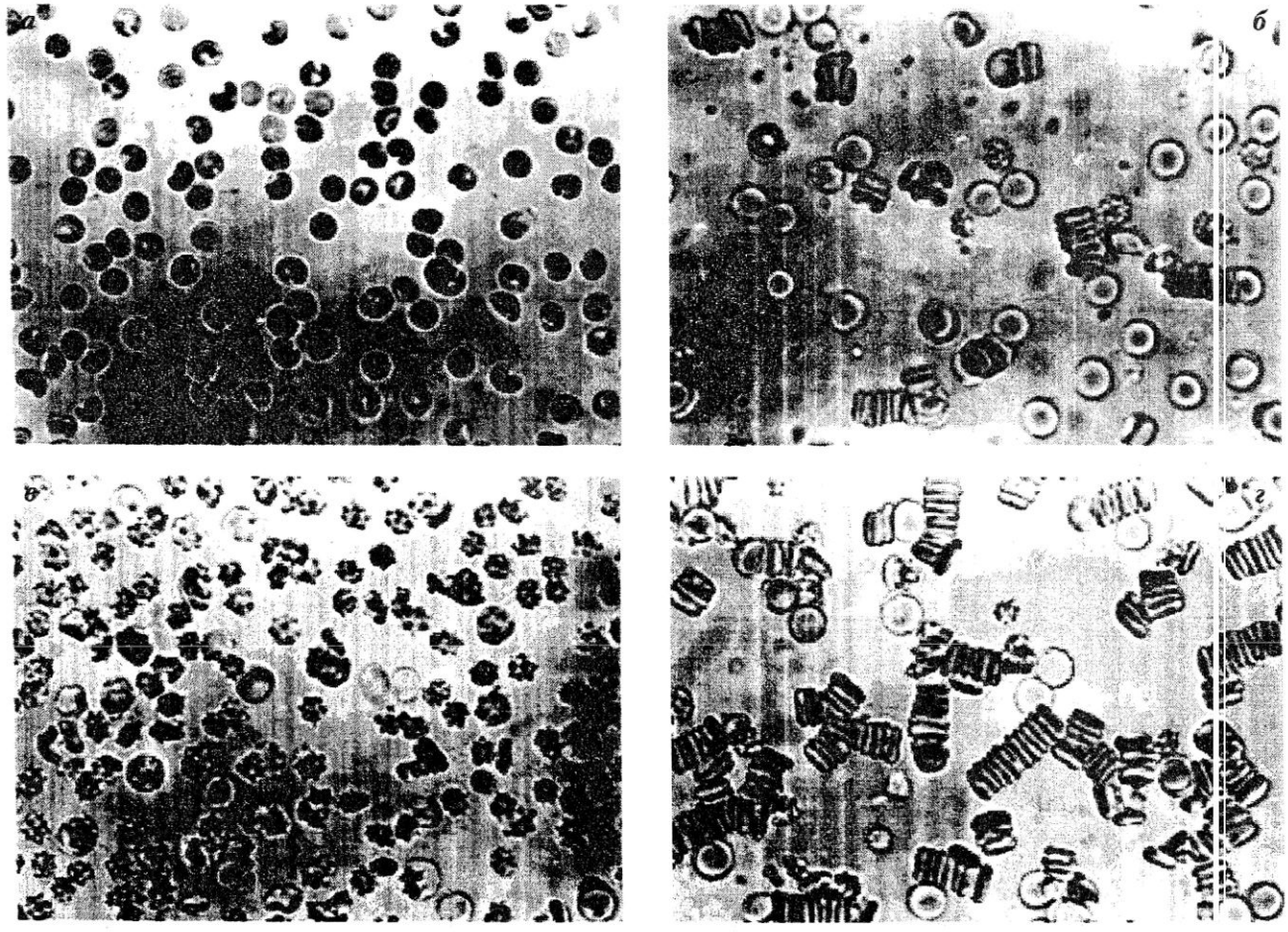


Рис. 3. Реакция эритроцитов в плазме на введение амфифильных соединений: *а* – хлорпромазина (360 мкМ); *б* – децилсульфата натрия (360 мкМ); *в* – 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфоната (40 мкМ); *г* – додецил-β,D-мальтозида (96 мкМ).

Fig 3. Erythrocytes' response to the introduction of amphiphilic compounds in plasm: *а* – chlorpromazine (360 μM); *б* – sodium decylsulphate (360 μM); *в* – 3-cetyldimethylammonium-1-propane sulphonate (40 μM); *г* – dodecyl-β,D-maltoside (96 μM).

Таким образом, ответ эритроцитов на введение амфифильных соединений определяется средой, в которой находились клетки. В физиологическом растворе, когда контрольные клетки изначально кренированы, трансформирующей активностью обладают все исследуемые соединения. При использовании эритроцитов цельной крови только катионное и цвиттеринное соединения вызвали изменение формы клеток.

Трансформация клеток обусловлена встраиванием веществ в мембрану. Так как в присутствии додецилмальтозида и децилалкил сульфата натрия эритроциты, находящиеся в плазме, оставались дискоцитами, можно предположить, что молекулы этих соединений были недоступны мембране. По-видимому, свободные белки плазмы сорбируют молекулы неионных и анионных соединений, либо белковый слой, покрывающий эритроцит, препятствует встраиванию данных веществ в мембрану.

В настоящее время для объяснения изменения формы эритроцитов под влиянием амфифильных соединений наиболее распространенной является гипотеза, предложенная Sheetz и Singer [9]. В ней липидный бислой рассматривается как структура, образованная двумя близко расположенными и сопряженными монослоями. При встраивании веществ в один из монослоев изменяется площадь этого монослоя по отношению к другому и в результате сопряжения монослоев изменяется форма клетки. Вещества, которые встраиваются во внешний монослой, приводят к трансформации клетки по типу дискоцит–эхиноцит, а вещества, молекулы которых распределяются во внутреннем монослое, вызывают появление в среде стоматоцитов.

Клетки, обработанные хлорпромазином, представляют собой стоматоциты, следовательно, молекулы данного соединения находятся во внутреннем монослое, обогащенном отрицательно заряженным фосфатидилсерином. Представители неионных, цвиттерионных и анионных амфифильных соединений приводили к появлению в среде эхиноцитов и сфероэхиноцитов, что свидетельствует об их локализации во внешнем монослое липидного бислоя. Таким образом, антигемолитической активностью обладают вещества, распределяющиеся как во внутреннем, так и в наружном монослоях липидного бислоя.

Исследуемые соединения проявляли антигемолитическую активность при гипертоническом шоке эритроцитов в том случае, когда клетки переносили в раствор, содержащий 4,0 М NaCl и амфифильное вещество. Если клетки предварительно инкубировали с амфифильными веществами, а затем подвергали действию гипертонического стресса, то антигемолитическая активность не проявлялась. Аналогичные результаты были получены финскими исследователями [6] при изучении гипотонического лизиса эритроцитов в присутствии амфифилов.

cytes. Obviously, plasm free proteins absorb the molecules of non-ionic and anionic compounds, or the protein layer, covering an erythrocyte, is an obstacle for the building-in of these proteins into the membrane.

Nowadays the hypothesis, proposed by Sheets and Signer [9], about the explanation of the change in an erythrocyte shape under the effect of amphiphilic compounds, is the most spread. Lipid bilayer in this hypothesis is considered as the structure, formed by two closely located and conjugated monolayers. When building-in the substances into one monolayer the area of this monolayer changes regarding to another one, and as the result of monolayers conjugation the cell shape changes. The substances, built-in into outer monolayer, result to cell transformation by the type of discocyte-echinocyte, and substances, molecules of those are redistributed in inner monolayer, cause the appearance of stomatocytes in the medium.

Treated by chlorpromazine cells, are stomatocytes, so, the molecules of the given compound are in an inner monolayer, enriched by negatively-charged phosphatidyl choline. Representatives of non-ionic, zwitterionic and anionic amphiphilic compounds resulted to the appearance of echinocytes and spheroechinocytes in the medium, that testifies to their localization in outer monolayer of lipid bilayer. Thus, the substances, redistributed both in inner and outer monolayers of a lipid bilayer, possessed antihemolytic activity.

Studied compounds manifested antihemolytic activity under hypertonic shock of erythrocytes in the case when the cells were transferred into the solution, containing 4.0 M NaCl and amphiphilic compound. Antihemolytic activity was not manifested, when the cells were preliminarily incubated with amphiphilic compounds, and then subjected to the effect of hypertonic stress. Similar results were obtained by Finnish investigators [6] when studying hypertonic lysis of erythrocytes in the presence of amphiphiles.

Thus, a protecting effect of amphiphilic compounds is realized in the moment of osmotic stress. The processes, related to the formation of hemolytic pore, are in the base of hypertonic damage of erythrocytes. Probably, a rapid absorption and redistribution of amphiphilic compounds in a lipid monolayer, accompanied by membrane rearrangements [8], prevents the formation of a lytic pore in an erythrocyte membrane under the conditions of hypertonic stress.

Coming from the fact, that the substances, various on the chemical structure possess a protecting activity, non-specific character of their effect can be stated.

Таким образом, защитное действие амфифильных соединений реализуется в момент осмотического стресса. В основе гипертонического повреждения эритроцитов лежат процессы, связанные с формированием гемолитической поры. Вероятно, быстрое встраивание и распределение амфифильных веществ в липидном монослое, сопровождаемые мембранными перестройками [8], предотвращают образование литической поры в эритроцитарной мембране в условиях гипертонического стресса.

Исходя из того, что протектирующей активностью обладают вещества, различные по химической структуре, можно говорить о неспецифическом характере их действия.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Кулешова Л. Г.* Трансформация эритроцитов человека в растворах неэлектролитов ряда Н-спиртов. Часть 1.Морфологический аспект взаимодействия // Пробл. криобиологии.– 1999.– № 1.– С. 9–13.
2. *Поздняков В. В.* Влияние состава и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к осмотическому и температурному шоку: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1989.– 16 с.
3. *Шпакова Н. М., Панталер Е. Р., Бондаренко В. А.* Антигемолитический эффект хлорпромазина при гиперосмотическом и холодовом шоке эритроцитов // Биохимия.– 1995.– 60, № 10.– С. 1624–1631.
4. *Шпакова Н. М., Панталер Е. Р., Орлова Н. В.* Влияние додецил-β,D-мальтозида на устойчивость предварительно дегидратированных эритроцитов к гипертоническому и холодовому шоку // Пробл. криобиологии.– 1999.– № 3.– С. 10–15.
5. *Bessis M.* Red cell shapes. An illustrated classification and its rationale // Red Cell Shape; Physiology, Pathology, Ultrastructure / Ed. by M. Bessis, R. I. Weed, P. F. Leblond.– Heidelberg: Springer-Verlag, 1973.– P. 1–24.
6. *Hagerstrand H., Izooma B.* Vesiculation induced by amphiphiles in erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta.– 1989.– 982, № 1.– P. 179–186.
7. *Jay A. W. V.* Geometry of the human erythrocyte. !. Effect of albumin on cell geometry // Biophys. J.– 1975.– 15, № 3.– P. 205–222.
8. *Rosso J., Zachowski A., Devaux P. F.* Influence of chlorpromazine on the transverse mobility of phospholipids in the human erythrocyte membrane: relation to shape changes // Biochim. Biophys. Acta.– 1988.– 942, № 2.– P. 271–279.

Поступила 25.07.2000

REFERENCES

1. *Kuleshova L. G.* Transformation of human erythrocytes in the solutions of non-electrolytes of H-alcohol row. Part 1. Morphological aspect of the interaction // Problemy kriobiologii.– 1999.– № 1.– P. 9–13.
2. *Pozdnyakov V. V.* The effect of composition and medium osmolarity on the erythrocytes' stability to osmotic and temperature shock: Auth. Thesis abstract, PhD (biology).– Kharkov, 1989.– 16 p.
3. *Shpakova N. M., Pantaler E. R., Bondarenko V. A.* Antihemolytic effect of chlorpromazine under hyperosmotic and cold shock of erythrocytes // Biohimiya.– 1995.– 60, № 10.– P. 1624–1631.
4. *Shpakova N. M., Pantaler E. R., Orlova N. V.* The effect of dodecyl-β, D-maltoside on the stability of preliminarily dehydrated erythrocytes to a hypertonic and a cold shock // Problemy kriobiologii.– 1999.– № 3.– P. 10–15.
5. *Bessis M.* Red cell shapes. An illustrated classification and its rationale // Red Cell Shape; Physiology, Pathology, Ultrastructure / Ed. by M. Bessis, R. I. Weed, P. F. Leblond.– Heidelberg: Springer-Verlag, 1973.– P. 1–24.
6. *Hagerstrand H., Izooma B.* Vesiculation induced by amphiphiles in erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta.– 1989.– 982, № 1.– P. 179–186.
7. *Jay A. W. V.* Geometry of the human erythrocyte. !. Effect of albumin on cell geometry // Biophys. J.– 1975.– 15, № 3.– P. 205–222.
8. *Rosso J., Zachowski A., Devaux P. F.* Influence of chlorpromazine on the transverse mobility of phospholipids in the human erythrocyte membrane: relation to shape changes // Biochim. Biophys. Acta.– 1988.– 942, № 2.– P. 271–279.

Accepted in 25.07.2000