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

Институт проблем криобиологии и криомедицины

3

1999

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

3
1999

# ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

## СОДЕРЖАНИЕ

### ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

*Катков И. И.* Некоторые аспекты осмотической реакции клеток. II. Объем воды и внутриклеточная концентрация проникающих криопротекторов в точках максимального отклонения объема в системах со многими растворенными веществами . . . . . 3

*Шпакова Н. М., Панталер Е. Р., Орлова Н. В.* Влияние додецил-β,D-мальтозида на устойчивость предварительно дегидратированных эритроцитов к гиперосмотическому и холодовому шоку . . 10

*Микулинский Ю. Е.* Регуляция активности белков холодового шока . . . . . 16

*Юрченко Т. Н., Белоножко А. П., Шарлай Т. М.* Динамика активности α-ГФДГ в клетках растущего и обновляющегося эпителия роговицы в процессе ее гипотермического хранения . . . . . 21

*Загнойко В. И.* О гипометаболическом влиянии фракции эпителия кишечника зимнеспящего суслика *C. undulatus* на консервирование эмбрионов млекопитающих . . . . . 27

*Нардид О. А.* Влияние замораживания на структурно-функциональные свойства некоторых гемопротеинов . . . . . 31

*Кравченко Л. П., Семенченко О. А., Семенченко А. Ю., Белоус А. М.* Влияние водно-солевого экстракта плаценты человека на сохранность изолированных гепатоцитов в условиях гипотермии . . 35

*Цуцаева А. А., Высеканцев И. П., Дарченко А. Л.* Динамика репаративных процессов в бактериях *Escherichia coli* после лиофилизации . . . . . 39

*Зинченко А. В., Зинченко В. Д.* Исследование акустической эмиссии в водных растворах глицерина и 1,2-пропандиола при охлаждении–нагреве . . . . . 43

*Кощий С. В., Луговой В. И., Компаниец А. М., Николенко А. В.* Криопротекторы ряда алкоксизамещенных глицерина . . . . . 46

### КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

*Керос В. А.* Криоконсервирование тестикулярной ткани плодов человека и создание низкотемпературного банка для последующего использования в клинической трансплантологии . . . . . 54

### КРИОМЕДИЦИНА

*Грищенко В. И., Щербина Н. А., Лазуренко В. В.* Некоторые аспекты применения локальной гипотермии в акушерско-гинекологической практике . . . . . 59

*Питько В. А.* Исследование влияния криоэкстракта хориона и экстракта плаценты на морфологические показатели при экспериментальном воспалительном процессе . . . . . 64

*Потапова Л. В.* Влияние имплантаций криоконсервированной ткани тимуса на иммунореактивность организма больных эндометриозом . . . . . 69

*Винник Ю. А., Котенко А. Е., Чибисов Л. П.* Интраоперационное криовоздействие в лечении рака прямой кишки . . . . . 72

### КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

*Сынчикова С. П.* Влияние глюкопиранозидов на устойчивость эритроцитов человека к гиперосмотическому стрессу . . . . . 77

*Бондаренко В. А., Кутиков А. Е., Никишкова И. Н.* Электроэнцефалограмма и морфофункциональные особенности головного мозга животных разного возраста при общем охлаждении . . . 80

© Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины, "Проблемы криобиологии", 1999

УДК 577.1: 57.043: 611–018.51 UDC 577.1: 57.043: 611–018.51

# Влияние додецил-β,D-мальтозида на устойчивость предварительно дегидратированных эритроцитов к гиперосмотическому и холодовому шоку

Н. М. ШПАКОВА, Е. Р. ПАНТАЛЕР, Н. В. ОРЛОВА

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

# The Effect of Dodecyl-β,D-maltozide on the Resistnace of Preliminarily Dehydrated Erythrocytes to Hyperosmotic and Cold Shock

N. M. SHPAKOVA, E. R. PANTALER, N. V. ORLOVA

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

Изучали совместное действие предварительной дегидратации эритроцитов и неионного амфифильного соединения додецил-β,D-мальтозида (ДМ) на устойчивость клеток к последующему гиперосмотическому воздействию. Получили антигемолитическую активность ДМ при перенесении клеток в 4,0 М NaCl. Протектирующий эффект амфифила наблюдался, если клетки подвергались гиперосмотическому стрессу при 37 °С. Характер и степень выраженности защитного действия ДМ определяются температурой предварительной дегидратации клеток. Обнаружили протектирующий эффект амфифила в условиях холодового шока эритроцитов (при охлаждении клеток в гипертонических средах от 37 до 0 °С).

Вивчали сумісну дію попередньої дегідратації еритроцитів і неіонної амфіфільної сполуки додецил-β,D-мальтозиду (ДМ) на стійкість клітин до наступної гіперосмотичної дії. Отримали антигемолітичну активність ДМ при перенесенні клітин в 4,0 М NaCl. Протектуючий ефект амфіфілу спостерігається, якщо клітини зазнають гіперосмотичного стресу при 37 °С. Характер і ступінь вираження захисної дії ДМ визначаються температурою попередньої дегідратації клітин. Виявили протектуючий ефект амфіфілу в умовах холодового шоку еритроцитів (при охолодженні в гіпертонічних середовищах від 37 до 0 °С).

Combined action of preliminary dehydration of erythrocytes and non-ionic apmphiphilic compound dodecyl-β,D-maltozide (DM) on a cell resistance to following hyperosmotic effect was studied. DM antihemolitic activity was revealed when the cells were transferred into 4.0 M NaCL. Protecting effect of amphiphile was observed, if the cells were subjected to hyperosmotic stress at 37 °C. The character and manifesting degree of protective DM effect are determined by the temperature of preliminary cell dehydration. Protecting effect of amphiphile was found under cold shock conditions of erythtocytes (during cells cooling in hypertonic media from 37 down to 0 °C).

Моделирование условий замораживания позволило установить, что чувствительность эритроцитов к высоким концентрациям солей можно изменять. Так, например, в результате предварительной инкубации в 0,45 М NaCl устойчивость эритроцитов к перенесению в 4,0 М NaCl возрастает [4]. Положительно заряженные производные фенотиазинового ряда хлорпромазин и трифторперазин также позволяют существенно повысить устойчивость эритроцитов как к холодовому, так и гипертоническому стрессу [2, 5]. Эти соединения оказывают многообразное действие на структуру и функцию клеток, их модифицирующий эффект проявляется на уровне как белковых, так и липидных компонентов [12]. Чтобы выяснить, являются ли защитные эффекты катионных амфифильных соединений в условиях гипертонического и холодового шока эритроцитов специфическими только для катионных фенотиазинов, необходимо было изучить особенности влияния неионных амфифилов, в частности ДМ, на устойчивость клеток к температурному и осмотическому воздействиям. Выбор данного соединения обусловлен его способ-

Modelling of freezing conditions permitted to establish, that erythrocyte sensitivity to high concentrations of salts can be modified. For example, in the result of preliminaty incubation in 0.45 M NaCl the resistance of erythrocytes to a transfer into 4.0 M NaCl increases [4]. Positively charged derivatives of phenothiazine row chlorpromazine and trifluoperazine also allow to significantly increase the resistance of erythrocytes both to a cold and hypertonic stress [5]. These compounds cause versatile effect on a structure and function of cells, their modifying effect is revealed both at the level of protein and lipid components [12]. In order to elucidate whether protective effects of cation amphiphilic compounds under conditions of hypertonic and cold shock of erythrocytes are specific only for cation phenothiazines, it would be necessary to study the peculiarities of the effect of non-ionic amphiphiles, in particular DM, on the resistance of cells to a temperature and osmotic effects. The selection of given compound is stipulated by its capability to protect the cells under conditions of hypotonic shock [9]. Morphological changes of cells under DM effect occur almost instantly, and the caused changes

ностью защищать клетки в условиях гипотонического шока [9]. Морфологические изменения клеток под действием ДМ происходят практически мгновенно, и вызванные изменения формы эритроцитов сохраняются в течение длительного времени (до 60 мин) [9]. Таким образом, ДМ проникает в мембрану достаточно быстро и не перераспределяется в ней со временем.

Цель работы – изучение влияния неионного амфифильного соединения ДМ и предварительной дегидратации клеток на чувствительность эритроцитов к гиперосмотическому шоку, развивающемуся при их добавлении к 4,0 М NaCl, а также действия данного соединения на дегидратированные клетки в условиях холодового шока при изменении температуры от 37 до 0 °С.

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-х часов при 0 °С. Среды готовили на 0,01 М фосфатном буфере, *pH* 7,4. В работе были использованы ДМ фирмы Calbiochem и реактивы отечественного производства квалификации ХЧ и ЧДА.

Гиперосмотический шок осуществляли следующим образом. С помощью поршневого дозатора Gilson по 50 мкл осадка эритроцитов переносили в 0,5 мл раствора NaCl (0,15–1,0 М) при заданной температуре (0 или 37 °С) и инкубировали 2 мин (этап предварительной инкубации). Затем из каждой пробы по 50 мкл осадка эритроцитов переносили в 1 мл 4,0 М NaCl при той же температуре на 5 мин (этап собственно гиперосмотического шока).

При холодовом шоке эритроцитов клетки инкубировали 10 мин в средах определенной тоничности при 37 °С, а затем переносили на то же время в среды той же тоничности при 0 °С. После этого клетки осаждали центрифугированием и при длине волны 543 нм спектрофотометрически определяли количество гемоглобина в супернатанте. Выход гемоглобина из клеток рассчитывали в процентах по отношению к 100%-му гемолизу в присутствии тритона Х-100 (0,1%).

Эритроциты характеризуются высокой чувствительностью к изменению осмотических условий среды [3]. Добавление клеток в растворы хлористого натрия повышенной тоничности, предшествующее действию гиперосмотического стресса, позволяет снизить уровень лизиса эритроцитов при их последующем перенесении в 4,0 М NaCl [2, 4, 5]. Из рис. 1 и 2 видно, что предварительная инкубация клеток в средах, содержащих NaCl в концентрации 0,2–0,6 М, сопровождается снижением уровня повреждения клеток при их последующем перенесении в 4,0 М NaCl как при температуре 37, так и при 0 °С, причем в последнем случае уровень гиперосмотического лизиса предварительно дегидратированных клеток гораздо ниже. Наши результаты хорошо согласуются с ранее полученными данными Позднякова [4], который связывает появление максимальной устойчивости эритроцитов, дегид-

in erythtocytes' shape keep within a long time (up to 60 min) [9]. Thus DM penetrates through a membrane quite rapidly and is not redistributed in it with a time.

The aim of this work was to investigate the effect of non-ionic amphiphilic compound DM and preliminary cell dehydration on the sensitivity of eryhtrocytes to hyperosomotic chock, developing at their adding to 4.0 M NaCl, as well as the effect of given compound on dehydrated cells under cold shock conditions during temperature changing from 37 to 0 °C.

Erythrocytes were obtained from donor's blood of the 2nd group. After removal of plasm an 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 at 0 °C. Media were prepared in 0.01 M phosphate buffer, *pH* 7.4. In the work we used DM (Calbiochem) and reagents of home production of "chemically pure" and "pure for analysis" qualification. Hyperosmotic shock was accomplished by the following way. By means of plunger dosator Gilson the erythrocyte sediment by 50 μl was removed into 0.5 ml of NaCl solution (0.15–1.0 M) at determined temperature (0 or 37 °C) and incubated during 2 min (stage of preliminary incubation). Then from every sample the erythrocyte sediment by 50 μl was transferred into 1 ml of 4.0 M NaCl at the same temperature for 5 min (stage of hyperosmotic shock itself). At cold shock of erythrocytes the cells were incubated for 10 min in the media of certain tonicity at 37 °C, and then were transferred into the media of the same tonicity at 0 °C for the same time. After this the cells were sedimented by centrifugation and the hemoglobin quantity in supernatant was spectrometrically determined at a wave length of 543 nm. Hemoglobin yielding from cells was calculated in a percentage in respect to 100% hemolysis in the presence of triton X-100 (0.1%).

Erythrocytes are characterized by a high sensitivity to the change in osmotic conditions of an environment [3]. Adding of cells into the solutions of sodium chloride of an increased tonicity, prior to the effect of hyperosmotic stress, allows to reduce the erythrocytes lysis level at their following transfer into 4.0 M NaCl [2, 4, 5]. Figs. 1 and 2 show that preliminary incubation of cells in the media, containing NaCl in the concentraitons of 0.2–0.6 M, is accompanied by a decrease in the level of cells damage at their following removal into 4.0 M NaCl both at the temperature of 37 and 0 °C, meanwhile at the latter case the level of hyperosmotic lysis of preliminarily dehydrated cells is much lower. Our results are well coordinated with earlier obtained data [4], associating the appearence of maximum resistance of erythrocytes, dehydrated under certain conditions, with volumetric changes of cells, accompanying by the modification of cytoskeleton-membrane complex. An increase in the salt concentration in the medium of preliminary incubation

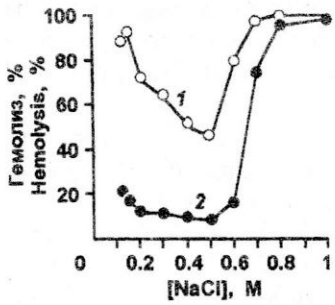



**Рис. 1.** Влияние ДМ на уровень гемолиза эритроцитов при перенесении в 4,0 М NaCl после предварительной инкубации в солевых дегидратирующих средах (температура 37 °С): *1* — контроль; *2* — ДМ ($7{,}5 \cdot 10^{-6}$ М).

**Fig. 1.** DM effect on the hemolysis level of erythrocytes when transferring them into 4.0 M NaCl after preliminary incubation in salt dehydrating media (temperature is 37 °C): *1* — control; *2* — DM ($7.5 \cdot 10^{-6}$ M).

ратированных в определенных условиях, с объемными изменениями клеток, сопровождающимися модификацией комплекса цитоскелет–мембрана. Повышение концентрации соли в среде предварительной инкубации (> 0,6 М) приводит к увеличению гемолиза клеток до уровня контроля (рис. 1, 2).

Данные о влиянии ДМ ($7{,}5 \cdot 10^{-6}$ М) на чувствительность к гиперосмотическому шоку предварительно дегидратированных эритроцитов представлены кривыми *2* на рис. 1 и 2. Неионный амфифил находился в лизирующей среде в концентрации $7{,}5 \cdot 10^{-6}$ М. Следует отметить, что эта концентрация ДМ гораздо ниже концентрации вещества, максимально эффективной при гипотоническом лизисе [9]. Если и предварительная инкубация клеток, и непосредственно гиперосмотический шок в 4,0 М NaCl осуществлялись при 37 °С, присутствие ДМ в лизирующей среде (4,0 М NaCl) позволяет существенно снизить гемолиз клеток (рис. 1). Выраженность эффекта ДМ при 37 °С определяется осмолярностью среды предынкубации. ДМ приводит к сглаживанию левого плеча кривой зависимости гиперосмотического лизиса от осмолярности сред предварительной инкубации. Начиная с концентрации хлористого натрия 0,6 М в среде предварительной инкубации, гемолиз эритроцитов в 4,0 М NaCl в присутствии амфифила увеличивается и достигает уровня контроля в области концентрации соли 0,8–1,0 М. Таким образом, при физиологической температуре присутствие ДМ в момент действия гиперосмотического стресса позволяет значительно снизить уровень гиперосмотического повреждения контрольных и умеренно дегидратированных клеток.

В условиях гиперосмотического стресса снижение температуры до 0 °С приводит к устранению защитного действия ДМ на клетки (рис. 2). При использовании в концентрации $7{,}5 \cdot 10^{-6}$ М данное соединение почти не оказывает на эритроциты дополнительного лизирующего действия в отличие от катионного амфифильного соединения хлорпромазина [5]. Это, по-видимому, связано с тем, что ДМ, вызывающий эхиноцитоз клеток, встраивается во внешний монослой мембраны, а хлорпромазин, индуцирующий стоматоцитоз, — во внутренний [9]. Липиды внешнего монослоя (фосфатидилхолин и сфингомиелин) лучше смешиваются и менее

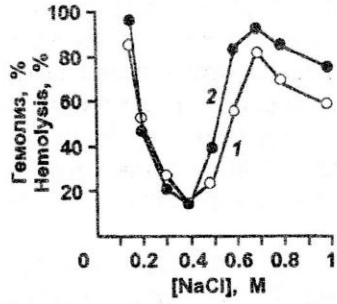



**Рис. 2.** Влияние ДМ на уровень гемолиза эритроцитов при перенесении в 4,0 М NaCl после предварительной инкубации в солевых дегидратирующих средах (температура 0 °С): *1* — контроль; *2* — ДМ ($7{,}5 \cdot 10^{-6}$ М).

**Fig. 2.** DM effect on the hemolysis level of erythrocytes when transferring them into 4.0 M NaCl after preliminary incubation in salt dehydrating media (temperature is 0 °C): *1* — control; *2* — DM ($7.5 \cdot 10^{-6}$ M).

(> 0.6 M) results into a rise of cell hemolysis upto the control level (Figs. 1, 2).

The data on DM effect ($7.5 \cdot 10^{-6}$ M) on the sensitivity to hyperosmotic shock of preliminarily dehydrated erythrocytes are represented by the curves *2* in Figs. 1 and 2. Nonionic amphiphile was in a lysing medium in the concentration of $7.5 \cdot 10^{-6}$ M. It should be noted, that this DM concentration is considerably lower than one of the substance, maximum effective at hypotonic lysis [9]. If preliminary both cell incubation and directly hyperosmotic shock in 4.0 M NaCl were performed at 37 °C, DM presence in a lysing medium (4.0 M NaCl) allows to significantly reduce cell hemolysis (Fig. 1). The manifestation degree of DM effect at 37 °C is determined by the preincubation medium osmolarity. DM results in the smoothing of the left shoulder of the dependency curve of hyperosmotic lysis on the osmolarity of preliminary incubation media. Starting from the concentration of sodium chloride of 0.6 M in the preliminary incubation medium, erythrocyte hemolysis in 4.0 M NaCl in the presence of apmphiphile increases and reaches the control level in the salt concentration range of 0.8–1.0 M. Thus at physiological temperature the DM presence in the moment of hyperosmotic stress action permits to considerably reduce the level of hyperosmotic damage of the control and moderately dehydrated cells.

Under conditions of hyperosmotic stress the reduction of temperature down to 0 °C results in an elimination of protective DM effect on cells (Fig. 2). When using this compound in the concentration of $7.5 \cdot 10^{-6}$ M it almost does not cause an additional lysing effect to erythrocytes in contrast to cation amphiphile compound chlorpromazine [5]. This is probably related to the fact, that DM, causing cell echinocytosis, builds into an outer monolayer of a membrane, and chlorpromazine, inducing stomatocytosis, — into an inner one [9]. Lipids of outer monolayer (phosphatidyl choline and sfingomyelin) are better mixed and less subjected to phase separation in comparison with the components of inner monolayer [1]. Thus, a slight manifestation degree of DM destabilizing effect at 0 °C, probably is substantiated by the fact, that the substance under low temperature, being locally concentrated, does not reach the level of lytic concentrations.

подвержены фазовому разделению по сравнению с компонентами внутреннего монослоя [1]. Таким образом, слабая выраженность дестабилизирующего эффекта ДМ при 0 °С, вероятно, обусловлена тем, что вещество, концентрируясь локально, при низкой температуре все же не достигает уровня литических концентраций.

Вышеописанные эксперименты включали: этап предварительной дегидратации и этап собственно гиперосмотического шока, на котором и реализовалось действие амфифила. Данные, представленные на рис. 1 и 2, свидетельствуют, что при температуре 37 °С проявляется антигемолитическая активность ДМ, тогда как при 0 °С эффект отсутствует. Однако не совсем правильно говорить о влиянии температуры на защитный эффект ДМ при изотермическом режиме эксперимента, когда оба этапа проводились либо при 0 °С, либо при 37 °С. В этом случае эритроциты находились в неравных условиях уже перед гиперосмотическим стрессом, так как одни клетки были исходно дегидратированы при 0 °С, а другие — при 37 °С.

Интересно было выяснить, зависит ли реализация защитного эффекта ДМ от температуры, при которой происходит собственно гиперосмотический лизис, либо характер действия ДМ определяется особенностями предварительной дегидратации клеток при различных температурах. В данном случае возможны 4 комбинации температурных условий ($37 \rightarrow 37$ °С, $0 \rightarrow 0$ °С, $0 \rightarrow 37$ °С и $37 \rightarrow 0$ °С), позволяющие выяснить вклад температуры на каждом этапе отдельно. Первые две уже были описаны выше; последняя не представляла интереса, так как добавляла к гиперосмотическому шоку еще и холодовой, вызванный охлаждением дегидратированных клеток [4, 5]. На рис. 3 представлены данные эксперимента, в котором предварительную дегидратацию клеток проводили при 0 °С, а собственно гиперосмотический шок в 4,0 М NaCl — при температуре 37 °С. Видно, что уровень гемолиза в присутствии ДМ существенно снижается как для умеренно дегидратированных эритроцитов, так и для клеток, достигших критического уровня дегидратации. В то же время амфифильное соединение проявляет невысокую антигемолитическую активность при данном температурном режиме эритроцитов, которые переносили в 4,0 М NaCl из физиологических по тоничности условий (рис. 3).

Таким образом, антигемолитическая активность ДМ проявляется, когда клетки подвергаются гиперосмотическому стрессу при 37 °С. В данном случае характер и степень выраженности протектирующего эффекта ДМ определяются температурой этапа предварительной дегидратации. Если клетки предварительно инкубировались в средах, содержащих 0,15–0,3 М NaCl, при физиологической температуре, то эффект ДМ в условиях гиперосмотического стресса проявляется в уменьшении чувствительности этих клеток к перенесению в 4,0 М NaCl. Дегидратация клеток при 0 °С сопровождается комплексом изменений, проявляющихся в конеч-

Mentioned above experiments included: the stage of preliminary dehydration and the stage of hyperosmotic shock itself, at which the action of anphiphile was realized. The data, represented in Figs. 1 and 2, testify, that at the temperature of 37 °C DM antihemolytic activity is manifested, meanwhile at 0 °C the effect is absent. However it is not correct to speak about the temperature effect on protective DM effect at isothermic regimen of an experiment, when both these stages were conducted either at 0 °C or 37 °C. In this case erythrocytes were under inequal conditions even before hyperosmotic stress, since one part of cells were initially dehydrated at 0 °C, another one — at 37 °C.

It was interesting to elucidate, whethet the realization of protective DM effect depends on a temperature, at which hyperosotic lysis itself takes place, or the character of DM action is determined by the peculiarities of preliminary cell dehydration under various temperatures. In this case 4 combinations of temperature conditions ($37 \rightarrow 37$ °C, $0 \rightarrow 0$ °C, $0 \rightarrow 37$ °C and $37 \rightarrow 0$ °C), allowing to discover the contribution of temparature at every stage in particular, are possible. The first two of them have already been described above; the latter was not of interest, because of the addition of a cold shock to hyperosmotic one, caused by cooling of dehydrated cells [4, 5]. Fig. 3 shows the experimental data, where preliminary cell dehydration was done at 0 °C, and hyperosmotic shock itself in 4.0 M NaCl at the temperature of 37 °C. It is obvious, that the hemolysis level in the DM presence significantly decreases both for moderately dehydrated erythrocytes and for cells, reached a critical level of dehydration. At the same time amphiphilic compound manifests not high antihemolytic activity at given temperature regimen of erythrocytes, which were transferred into 4.0 M NaCl from physiological on tonicity conditions (Fig. 3).

Thus, antihemolytical activity of DM manifests when the cells are subjeceted to hyperosmotic stress at 37 °C. In this case the character and manifestation degree of DM protecting effect are determined by the temperature of the stage of preliminary dehydration. If cells were preliminarily incubated in the media, containing 0.15–0.3 M NaCl at physiological temperature, then DM effect under conditions of hyperosmotic stress is manifested in the reduction of these cells sensitivity to a removal into 4.0 M NaCl. Cell dehydration at 0 °C is accompanied by the complex of the changes, finally revealing in a considerable decrease in the DM presence of the level of hyperosmotic hemolysis of cells, preincubated in the media with NaCl concentration $> 0.6$ M NaCl. This testifies to the fact, that the preincubation temperature of cells determines the character of DM effect on the development of hyperosmotic lysis in 4.0 M NaCl at 37 °C. Combined application of media of preliminary dehydration and certain temperature regimen of dehydration stage allows to obtain antihemolytical ac-

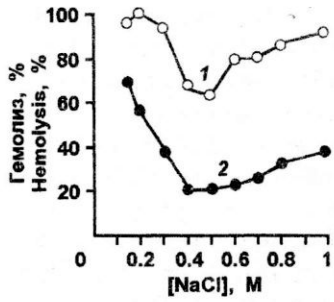



**Рис. 3.** Влияние ДМ на уровень гемолиза эритроцитов при перенесении в 4,0 М NaCl после предварительной инкубации в солевых дегидратирующих средах (температура дегидратирующих сред 0 °С, температура 4,0 М NaCl 37 °С): *1* — контроль; *2* — ДМ ($7{,}5 \cdot 10^{-6}$ М).

**Fig. 3.** DM effect on the hemolysis level of erythrocytes when transferring them into 4.0 M NaCl after preliminary incubation in salt dehydrating media (temperature of dehydrating media is 0 °C, temperature of 4.0 M NaCl is 37 °C): *1* — control; *2* — DM ($7.5 \cdot 10^{-6}$ M).

ном итоге в значительном снижении в присутствии ДМ уровня гиперосмотического гемолиза клеток, предынкубированных в средах с концентрацией NaCl > 0,6 М. Это свидетельствует о том, что температура предынкубации клеток определяет характер влияния ДМ на развитие гиперосмотического лизиса в 4,0 М NaCl при 37 °С. Сочетанное использование сред предварительной дегидратации и определенного температурного режима этапа дегидратации позволяет получить антигемолитическую активность вещества во всем исследованном диапазоне сред предварительной инкубации. Кривая зависимости гемолиза клеток в 4,0 М NaCl от осмолярности сред предварительной дегидратации имеет перевернутую колоколообразную форму с минимальным значением лизиса в 0,45 М NaCl. ДМ позволяет убрать как левое, так и правое плечо данной кривой в зависимости от выбранного температурного режима этапа дегидратации.

Было исследовано влияние ДМ на чувствительность эритроцитов к холодовому шоку. На рис. 4 представлена зависимость уровня гемолиза эритроцитов от концентрации соли в среде при сдвиге температуры от 37 до 0 °С. Как видно, гемолиз клетки резко возрастает, начиная с концентрации NaCl 0,75 М, и достигает максимума в среде, содержащей 1,2 М NaCl. ДМ в концентрации $7{,}5 \cdot 10^{-6}$ М оказывает небольшое защитное влияние на клетки, выраженное гораздо слабее по сравнению с аналогичным эффектом катионного соединения хлорпромазина [5].

Известно, что амфифилы в сублитических концентрациях защищают эритроциты от гипотонического гемолиза [6]. Но при больших концентрациях эти же вещества индуцируют гемолиз эритроцитов даже в изотонической среде. Например, ДМ в концентрации 40 мкМ значительно снижает гипотонический лизис эритроцитов, тогда как амфифил вызывает повреждение клеток при концентрациях свыше 60 мкМ [9]. Такое бифазное поведение амфифилов при повышении концентрации характерно для большого количества химически разнородных соединений и, по-видимому, является следствием амфифильного характера веществ.

Молекула ДМ по форме представляет собой усеченный конус (большая площадь сечения у полярной головы и небольшая у гидрофобной части). Следовательно, такие молекулы должны оказывать при встраивании в липидный бислой дестабилизирующее действие. Так как ДМ индуцирует быструю трансформацию клеток по типу дискоцит-эхи-

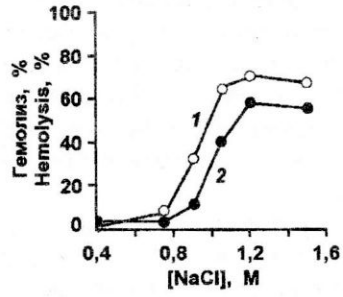



**Рис. 4.** Влияние ДМ на уровень гемолиза эритроцитов при холодовом шоке (охлаждение от 37 до 0 °С в гипертонических средах): *1* — контроль; *2* — ДМ ($7{,}5 \cdot 10^{-6}$ М).

**Fig. 4.** DM effect on the hemolysis level of erythrocytes at cold shock (cooling from 37 down to 0 °C in hypertonic media): *1* — control; *2* — DM ($7.5 \cdot 10^{-6}$ M).

tivity of the substance in all investigated range of media of preliminary incubation. The dependecy curve of cell hemolysis in 4.0 M NaCl on the osmolarity of media of preliminary dehydration has a turned over bell-like form with a minimum lysis value in 0.45 M NaCl. DM permits to eliminate both left and right shoulder of this curve depedning on the chosen temperature regimen of dehydration stage.

DM effect on erythrocyte sensitivity to a cold shock was studied. Fig. 4. demonstrates the dependency of erythrocyte hemolysis level on salt concentration in the medium at temperature shift from 37 down to 0 °C. As it is seen, cell hemolysis sharply increase, starting from the concentration of NaCl 0.75 M and reaches the maximum in the medium, containing 1.2 M NaCl. DM in the concentration of $7.5 \cdot 10^{-6}$ M causes a slight protective effect on cells, that was manifested considerably slighter in comparison with analogous effect of cation compound chlorpromazine [5].

It is known, that amphiphiles in sublytic concentrations protect erythrocytes against hypotonic hemolysis [6]. However under high concentrations the same substances initiate hemolysis of erythrocytes even in an isotonic medium. For example, DM in the concentration of 40 μM significantly decreases hypotonic lysis of erythrocytes, meanwhile as amphiphile causes the cell damage under concentration higher than 60 μM [9]. Such biphase behavior of amphiphiles, when rising the concentration, is characteristic for a great number of various compounds and, perhaps, is the consequence of apmphiphilic character of the substances.

DM molecule shape is a truncated cone (a large section square in polar head and not large in hydrophobic part). So these molecules should cause during building into a lipid bilayer a destabilizing effect.

Since DM initiates a rapid cell transformation on the type discocyte-echinocyte and achieved degree of echinocytosis does not change with a time, then DM does not penetrate into an inner monolayer of a membrane. An outer monolayer must be subjected to a considerable stress. However taking into consideration the fact, that integrity of a cell and bilayer preserves in the presence of amphiphilic molecules, one can suppose, that in membrane there are processes, resulting in a rapid redistribution of bilayer lipids between two monolayers, that keeps a stable bilayer configuration. The data on redistribution of spin-la-

ноцит и достигнутая степень эхиноцитоза не изменяется во времени, ДМ не проникает во внутренний монослой мембраны. Наружный монослой должен подвергаться значительному стрессу. Но исходя из того, что целостность клетки и бислоя сохраняется в присутствии амфифильных молекул, можно полагать, что в мембране происходят процессы, приводящие к быстрому перераспределению липидов бислоя между двумя монослоями, которое поддерживает стабильную бислойную конфигурацию. Об этом свидетельствуют данные о перераспределении спин-меченых фосфолипидов под действием хлорпромазина [10] и флюоресцентно-меченых фосфолипидов в присутствии алифатических спиртов [11]. Амфифилы в сублитических концентрациях вызывают освобождение мембранных везикул [9] и потерю мембранного материала [7].

Все это позволяет предположить, что антигемолитическая активность амфифильных соединений может быть обусловлена именно мембранными перестройками, запускаемыми при встраивании амфифилов в бислой.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Белоус А.М., Бондаренко В.А.* Структурные изменения биологических мембран при охлаждениии.– Киев: Наук. думка, 1982.– 255 с.
2. *Дунаевская О.Н., Панталер Е.Р., Шпакова Н.М., Бондаренко В.А.* Некоторые возможности повышения устойчивости эритроцитов к холодовому и гиперосмотическому воздействию при использовании катионных амфифилов // Пробл. криобиологии.– 1995.– № 1.– С. 21–27.
3. *Дунаевская О.Н., Шпакова Н.М.* Защитный эффект трифторперазина при гиперосмотическом шоке эритроцитов // Укр. биохим. журн.– 1997.– 69, № 2.– С. 30–34.
4. *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.
5. *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.
6. *Isomaa B., Hagerstrand H., Paatero G., Engblom A.C.* Permeability alterations and antihaemolysis induced by amphiphiles in human erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta.– 1986.– 860, № 3.– P. 510–524.
7. *Maher P., Singer S.J.* Structural changes in membranes produced by the binding of small amphiphatic molecules // Biochemistry.– 1984.– 23.– P. 232–240.
8. *Minetti M., Di Stasi A.M.M.* Involvement of erythrocyte skeletal proteins in the modulation of membrane fluidity by phenothiazines // Biochemistry.– 1987.– 26, № 25.– P. 8133–8138.
9. *Hagerstrand H, Isomaa D.* Amphiphile-induced antihaemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation // Chem.-Biol. Interact.– 1991.– 79.– P. 335–347
10. *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.
11. *Schwichtenhovel C., Deuticke B., Haest C.W.M.* Alcohols produce reversible and irreversible acceleration of phospholipid flip-flop in the human erythrocyte membrane // Biochim. Biophys. Acta.– 1992.– 1111, № 1.– P. 35–44.
12. *Svetina S., Vrhovec S., Gros M., Zeks B.* Red blood cell membrane as a possible model system for studying mechanisms of chlorpromazine action // Acta Pharm.– 1992.– 42, № 1.– P. 25–35.


Поступила 21.07.98

belled phospholipids under chlorpromazine effect [10] and fluorescent-labelled phospholipids in the presence of aliphatic alcohols [11] confirm this. Amphiphiles in sublytic concentrations cause a release of membrane vesicles [9] and loss of membrane material [7].

All this allows to suppose, that antihemolytical activity of amphiphilic compounds can be stipulated by the membrane rearrangements, triggered during amphiphile building into a bilayer.

## REFERENCES


1. *Belous A.M., Bondarenko V.A.* Biological membrane structural alterations under cooling conditions.– Kiev: Naukova dumka, 1982.– 255 p.
2. *Dunayevskaya O.N., Pantaler E.R., Shpakova N.M., Bondarenko V.A.* Some possibilities of enhancement of erythrocytes resistance to cold and hyperosmotic effect using cationic amphipates // Probl. of Cryobiology.– 1995.– № 1.– P. 21–27.
3. *Dunayevskaya O.N., Shpakova N.M.* Threefluorperazine protective effect under erythrocytes hyperosmotic shock conditions // Ukr. Biochem. Journ.– 1997.– 69, № 2.– P. 30–34.
4. *Pozdnyakov V.V.* The effect of media composition and osmolarity on erythrocytes resistance to osmotic and temperature shock. Author abstract for PhD (biology) obtaining.– Kharkov, 1989.– 16 p.
5. *Shpakova N.M., Pantaler E.R., Bondarenko V.A.* Chlorpromazine antihaemolitic effect under erythrocytes hyperosmotic and cold shock conditions // Biochemistry.– 1995.– 60, № 10.– P. 1624–1631.
6. *Isomaa B., Hagerstrand H., Paatero G., Engblom A.C.* Permeability alterations and antihaemolysis induced by amphiphiles in human erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta.– 1986.– 860, № 3.– P. 510–524.
7. *Maher P. and Singer S.J.* Structural changes in membranes produced by the binding of small amphiphatic molecules // Biochemistry.– 1984.– 23.– P. 232–240.
8. *Minetti M., Di Stasi A.M.M.* Involvement of erythrocyte skeletal proteins in the modulation of membrane fluidity by phenothiazines // Biochemistry.– 1987.– 26, № 25.– P. 8133–8138.
9. *Hagerstrand H, Isomaa D.* Amphiphile-induced antihaemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation // Chem.-Biol. Interact.– 1991.– 79.– P. 335–347
10. *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.
11. *Schwichtenhovel C., Deuticke B., Haest C.W.M.* Alcohols produce reversible and irreversible acceleration of phospholipid flip-flop in the human erythrocyte membrane // Biochim. Biophys. Acta.– 1992.– 1111, № 1.– P. 35–44.
12. *Svetina S., Vrhovec S., Gros M., Zeks B.* Red blood cell membrane as a possible model system for studying mechanisms of chlorpromazine action // Acta Pharm.– 1992.– 42, № 1.– P. 25–35.


Accepted in 21.07.98