

Чувствительность эритроцитов млекопитающих к изменению температурных и осмотических условий среды

С.С. ЕРШОВ, Н.В. ОРЛОВА, Н.М. ШПАКОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Mammalian Erythrocyte Sensitivity to Change in Temperature and Osmotic Medium Conditions

S.S. ERSHOV, N.V. ORLOVA, N.M. SHPAKOVA

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

Исследовали особенности осмотической и температурной чувствительности эритроцитов млекопитающих (быка, собаки и лошади) и влияния хлорпромазина (ХП) на их гипертонический гемолиз. Полученные результаты позволили выявить видовую чувствительность эритроцитов к различным стрессовым факторам. Показана минимальная чувствительность клеток собаки, а максимальная – эритроцитов быка как к повышению концентрации NaCl в изотермических условиях, так и к изменению температуры гипертонической среды инкубации. Добавление ХП в гипертоническую среду позволяет снизить уровень повреждения эритроцитов млекопитающих. Значения антигемолитической активности данного соединения для всех исследуемых эритроцитов существенно не отличаются (около 80%), в то время как диапазон эффективных концентраций ХП возрастает в ряду: бик, лошадь, собака.

Ключевые слова: эритроциты животных, гипертонический гемолиз, хлорпромазин

Досліджували особливості осмотичної і температурної чутливості еритроцитів ссавців (бика, коня, собаки) і впливу хлорпромазину (ХП) на їх гіпертонічний гемолиз. Отримані результати дозволили виявити видову чутливість еритроцитів до дії різних стресових факторів. Показана мінімальна чутливість клітин собаки, а максимальна – еритроцитів бика як до підвищення концентрації NaCl в ізотермічних умовах, так і до зміни температури гіпертонічного середовища інкубації. Додавання ХП у гіпертонічне середовище дозволяє знизити рівень ушкодження еритроцитів ссавців. Значення антигемолітичної активності даної сполуки для всіх досліджуваних еритроцитів істотно не відрізняються (близько 80%), у той час як діапазон ефективних концентрацій ХП зростає у ряду: бик, кінь, собака.

Ключові слова: еритроцити тварин, гіпертонічний гемолиз, хлорпромазин

The authors have investigated the peculiarities of osmotic and temperature mammalian erythrocyte sensitivity (bovine, canine and equine) and chlorpromazine (ChP) effect on their hypertonic hemolysis. The obtained results have allowed to reveal the species' erythrocytes sensitivity to various stress factors. The minimum sensitivity of canine cells is shown and the maximum of bovine erythrocytes both to an increase of NaCl concentration in isothermal conditions and to the change in temperature of hypertonic incubation medium as well. ChP adding to hypertonic medium allows decreasing in the damage level of mammalian erythrocytes. Antihemolytic activity values of the presented compound for all the investigated erythrocytes do not differ considerably (about 80%), meanwhile the range of ChP effective concentrations increases in the row: bovine, equine, canine.

Key-words: animal erythrocytes; hypertonic hemolysis; chlorpromazine.

Проблеме изучения чувствительности эритроцитов человека к изменению как температурных, так и осмотических факторов окружающей среды уделялось большое внимание [2]. Перенесение эритроцитов человека в гипертонические среды сопровождается температурно-зависимым повреждением клеточной мембраны, которое может завершаться выходом гемоглобина из клетки [4]. Существуют методы, позволяющие снизить чувствительность человеческих эритроцитов к повреждающим факторам криоконсервирования [1, 5, 6]. Представляло интерес выяснить, присущи ли особенности, выявленные при изучении температурно-осмотической чувствительности эритроцитов человека, и эритроцитам других млекопитающих, либо они характеризуются видоспецифичностью.

Адрес для корреспонденции: Шпакова Н.М., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-01-35, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Great attention was paid to investigation of the problem of human erythrocyte sensitivity to the changes in both temperature and osmotic environmental factors [2]. Removal of erythrocytes into hypertonic media is accompanied with temperature-dependent damage of cellular membrane, which may be completed by hemoglobin release out of a cell [4]. There are methods, allowing to decrease human erythrocytes sensitivity to the damaging cryopreservation factors [1, 5, 6]. It was of interest to elucidate, if their own distinctive features, revealing at temperature-dependent human erythrocytes sensitivity studying were inherent to other mammalian erythrocytes as well, or they were characterized with the specificity of the species.

The aim of the work is to investigate the peculiarities of osmotic and temperature sensitivity of

Address for correspondence: Shpakova N.M., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 772 0135, fax: +380 57 772 0084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Цель данной работы – исследовать особенности осмотической и температурной чувствительности эритроцитов млекопитающих (быка, собаки и лошади) и влияние ХП на гипертонический гемолиз клеток.

Материалы и методы

В работе были использованы ХП гидрохлорид фирмы "Calbiochem", реактивы отечественного производства квалификации х.ч. и ч.д.а.

Эритроциты получали из крови быка, лошади и собаки (стабилизатор 4%-й цитрат натрия). Все используемые среды готовили на 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,4.

Для гипертонического стресса эритроциты переносили в раствор, содержащий 4,0 М NaCl, при заданной температуре на 10 мин (гематокрит 0,4%). ХП добавляли в литическую среду перед внесением клеток. После завершения времени инкубирования клетки осаждали центрифугированием и спектрофотометрически определяли количество гемоглобина в супернатанте при длине волны 543 нм. Выход гемоглобина из клеток рассчитывали в процентах по отношению к 100 %-му гемолизу эритроцитов в присутствии тритона X-100 (0,1 %).

Значение максимальной антигемолитической активности амфифильного соединения рассчитывали по формуле:

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

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

Результаты и обсуждение

Для изучения гипертонической чувствительности эритроцитов различных видов животных (бык, лошадь, собака) клетки переносили в среды, содержащие NaCl в концентрации от 1,0 до 4,0 М, при 37°C (рис. 1).

Видно, что в достаточно широком диапазоне концентраций NaCl клетки не повреждаются и лишь при превышении так называемой пороговой концентрации электролита наблюдается увеличение уровня гемолиза клеток, превышающее 10%. Исследуемые эритроциты млекопитающих характеризуются различной пороговой чувствительностью к гипертонической электролитной среде. Величины пороговой концентрации для эритроцитов быка, лошади и собаки составляют 2,25; 2,50 и 2,75 М NaCl соответственно (рис. 1).

Кроме того, приращение уровня гемолиза эритроцитов при превышении пороговой концен-

mammalian erythrocytes (bovine, canine, equine) and the ChP effect on cellular hypertonic hemolysis.

Materials and methods

In the work there were used ChP hydrochloride ("Calbiochem"), home made reagents of chemically pure and pure for analysis grade.

Erythrocytes were obtained from bovine, equine and canine blood (4% sodium citrate as the stabilizer). All used media were prepared, using 0.01 M phosphate buffer, pH 7.4.

For hypertonic stress the erythrocytes were transferred into the solution, containing 4.0 M of NaCl, at fixed temperature for 10 minutes (hematocrit 0.4%). ChP was added into lytic medium before cells introduction. After incubation period finishing, the cells were centrifuged and the number of hemoglobin in supernatant was detected spectrophotometrically at 543 nm wave length. Hemoglobin release out of cells was calculated in percentage, according to 100% erythrocytes' hemolysis in the X-100 triton presence (0.1 %).

The value of maximum antihemolytic activity of amphiphilic compound was calculated by the formula:

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

where, k is the value of erythrocytes hemolysis in the absence of amphiphilic substance; a is the minimum value of erythrocytes hemolysis in the presence of amphiphilic substance.

Results and discussion

For the investigation of hypertonic erythrocyte sensitivity of various animal species' (bovine, equine, canine) cells were transferred into the media, obtaining NaCl under concentration from 1.0 to 4.0 M under 37°C (Fig.1).

It is seen, that in quite a wide range of NaCl concentrations the cells are not damaged and only at an exceed of called as threshold electrolyte concentration is observed the increase of cells hemolysis level, exceeding 10%. Investigated mammalian erythrocytes are characterized by various threshold sensitivity to the hypertonic electrolytic medium. Values for threshold concentration for bovine, equine and canine erythrocytes are 2.25; 2.50 and 2.75 M NaCl, correspondingly (Fig.1).

Moreover, the increment of erythrocytes hemolysis level at the exceeding of threshold concentration of NaCl has species differences as well and while of its increasing, cells can be located in the following row: canine < equine < bovine erythrocytes.

Thus bovine cells are characterized by the highest sensitivity to the hypertonic concentrations of NaCl, meanwhile canine erythrocytes are quite resistant to hypertonic effect.

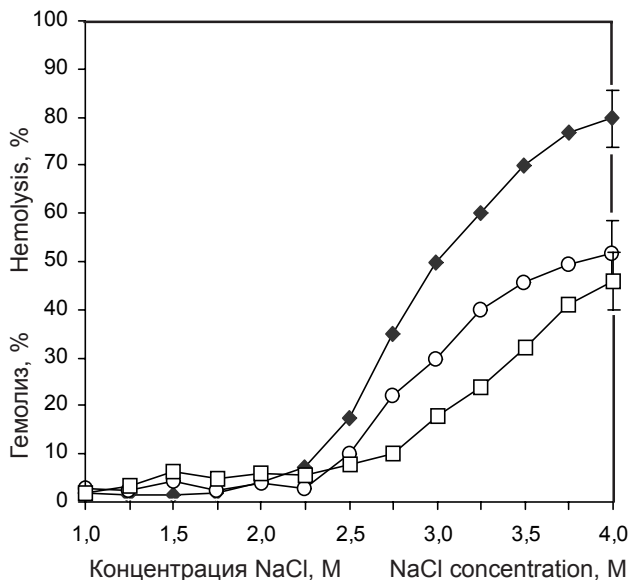


Рис. 1. Зависимость уровня гипертонического гемолиза эритроцитов собаки (□), лошади (○), быка (◆) от концентрации NaCl (температура 37°C).

Fig. 1. Dependence of the level of canine (□), equine (○), bovine (◆) erythrocytes hypertonic hemolysis on NaCl concentration (37°C temperature).

трации NaCl также имеет видовые различия и по мере его увеличения клетки можно расположить в следующем ряду: собака < лошадь < бык.

Таким образом, клетки быка характеризуются самой высокой чувствительностью к гипертоническим концентрациям NaCl, в то время как эритроциты собаки достаточно устойчивы к гипертоническому воздействию.

Исходя из того, что уровень гипертонического повреждения эритроцитов человека является температурно-зависимым [4], мы исследовали гемолиз эритроцитов млекопитающих в 4,0 М NaCl при различной температуре (рис. 2).

Анализ профилей кривых температурных зависимостей гипертонического гемолиза эритроцитов млекопитающих показал, что возрастание уровня гемолиза клеток при повышении температуры характерно для эритроцитов всех видов животных.

При 0°C гемолиз эритроцитов лошади и быка незначителен, а уровень гемолитического повреждения клеток собаки составляет 30%. Разность между максимальным и минимальным значениями уровня гемолиза эритроцитов лошади, быка и собаки составляет 40, 70 и 30% соответственно. Таким образом, клетки быка в условиях гипертонического стресса обладают максимальной чувствительностью к изменению температурного режима по сравнению с эритроцитами собаки и лошади (рис. 2).

Полученные результаты позволили выявить видовую чувствительность эритроцитов к различ-

Proceeding from the fact, that the level of hypertonic damage of human erythrocytes is temperature-dependent [4], we have investigated the hemolysis of mammalian erythrocytes in 4.0 M NaCl at various temperatures (Fig. 2).

The analysis of profile of temperature dependency curves of hypertonic mammalian erythrocytes hemolysis has shown that the increase of the level of cell hemolysis at the temperature increase is the characteristic for all erythrocytes of animal species.

At 0°C equine and bovine erythrocytes hemolysis was not considerable, and the level of hemolytic damage of canine cells was 30%. The difference between minimum and maximum values of the level of equine, bovine and canine erythrocyte hemolysis is 40, 70 and 30%, correspondingly. Thus bovine cells under hypertonic stress possess a maximum sensitivity to the change in temperature regimen, comparing with the canine and equine erythrocytes (Fig. 2).

Obtained results allowed to reveal the sensitivity of erythrocytes species to various stress factors. Both at the increase of NaCl concentration increasing under isothermic conditions (see Fig. 1), and the temperature changing during incubation of cells in 4.0 M NaCl (Fig. 2) canine cells have minimum sensitivity, and bovine erythrocytes have the maximum one. In spite of the stress factor nature, the character of species erythrocytes sensitivity is unchanged.

During the studying hemolysis, induced by salts of bile acid, and the hypotonic lysis of mammalian

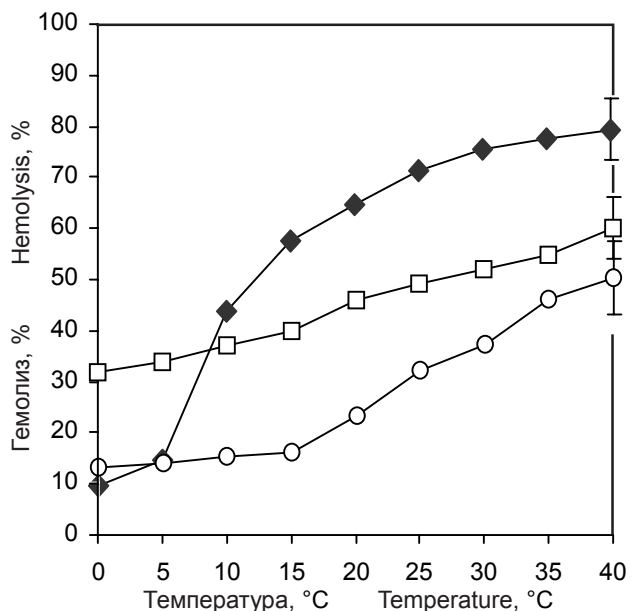


Рис. 2. Температурная зависимость гипертонического гемолиза эритроцитов собаки (□), лошади (○), быка (◆) в среде, содержащей 4,0 М NaCl.

Fig. 2. Temperature dependence of canine (□), equine (○), bovine (◆) erythrocytes hypertonic hemolysis in the medium, containing 4.0 M NaCl.

ным стрессовым факторам. Как при повышении концентрации NaCl в изотермических условиях (см. рис. 1), так и при изменении температуры при инкубации клеток в 4,0 М NaCl (рис. 2) минимальной чувствительностью обладают клетки собаки, а максимальной – эритроциты быка. Несмотря на природу стрессового фактора, характер видовой чувствительности эритроцитов сохраняется.

При изучении гемолиза, индуцированного солями желчной кислоты, и гипотонического лизиса эритроцитов млекопитающих было показано, что эритроциты быка по сравнению с эритроцитами лошади также характеризуются более высокой чувствительностью к указанным типам лизиса [13]. Авторы работы [15] обнаружили корреляцию между чувствительностью эритроцитов различных животных к гемолизу из *Vibrio vulnificus* и гипотоническим средам. Однако результаты, полученные при исследовании лизиса, индуцированного гемолизином из *Fusobacterium necrophorum* [7], показали обратную зависимость. Так, эритроциты лошади и собаки были весьма чувствительны к гемолизин-индуцированному лизису в отличие от клеток быка.

Электрический пробой приводит к различному изменению транспортных характеристик мембран эритроцитов, отличающихся по содержанию K^+ [10]. Так, увеличение потоков ионов Na^+ , K^+ и Ca^{2+} было зарегистрировано для эритроцитов, характеризующихся высоким содержанием внутриклеточного калия, и не наблюдалось для эритроцитов с низким его содержанием.

Эритроциты млекопитающих по содержанию внутриклеточного калия делят на две большие группы: клетки с высоким и низким содержанием K^+ . К первой группе относятся эритроциты человека, лошади, второй – эритроциты быка и собаки [10]. Однако полученные нами данные о высокой осмотической и температурной чувствительности эритроцитов быка и низкой клеток собаки свидетельствуют о том, что чувствительность исследуемых эритроцитов к стрессовым факторам не зависит от внутриклеточного содержания K^+ .

Сравнительное исследование фосфолипидного состава плазматических мембран эритроцитов млекопитающих [9, 12] показало, что мембраны эритроцитов быка в отличие от эритроцитарных мембран лошади и собаки фактически лишены фосфатидилхолина. При изучении слияния эритроцитов разных видов млекопитающих было обнаружено, что слиянию не подвергаются клетки, мембраны которых лишены фосфатидилхолина. Встраивание его в бычьи эритроциты сопровождалось слиянием клеток [8].

Таким образом, полученные видовые различия чувствительности клеток к изменению темпера-

erythrocytes it was shown that bovine erythrocytes, comparing with equine erythrocytes are characterised by higher sensitivity to the mentioned lysis types as well [13]. The authors of the work [15] found the correlation between erythrocytes sensitivity of various animals to hemolysin from *Vibrio vulnificus* and hypotonic media. However the investigation of the lysis, induced by hemolysin of *Fusobacterium necrophorum* [7], showed an inverse dependence. Thus equine and canine erythrocytes were greatly sensitive to the hemolysin-induced lysis, comparing with bovine cells.

Electric clamp resulted in various change in transport membrane characteristics of erythrocytes, differing on the K^+ content [10]. Thus the increase of ion fluxes of Na^+ , K^+ and Ca^{2+} was recorded for the erythrocytes, characterized with a high content of intracellular potassium, and that was not observed in erythrocytes with its low content.

Mammalian erythrocytes according to the content of intracellular potassium are divided into two large groups: cells with a high and low content of K^+ . Human, equine erythrocytes belong to the first group, and bovine and canine do to the second one [10]. But the obtained data about high osmotic and temperature sensitivity of bovine erythrocytes and low one of canine testify that the sensitivity of investigated erythrocytes to the stress factors does not depend on intracellular K^+ content.

Comparative study of phospholipid composition of mammalian erythrocytes plasmatic membranes [9, 12] has shown that those of bovine erythrocytes, comparing with equine and canine ones are deprived of phosphatidylcholine. When investigating the fusion of erythrocytes of various mammalian species there was found that the cells which membranes are phosphatidylcholine deprived were not subjected to fusion. Its building into bovine erythrocytes was accompanied by cell fusion [8].

Thus the obtained differences between species in sensitivity of cells to the change in temperature and osmotic factors of environment are connected to the peculiarities of their plasmatic membrane structure.

It is known [3, 6] that ChP, being the cation derivative of phenothiazine, shows a high antihemolytic activity at hypertonic hemolysis of human erythrocytes. Presented amphiphilic compound inserts into erythrocyte membrane, causing a fast alteration of cell shape [3, 11]. Observed erythrocytes stomatocytosis in the ChP presence is stipulated by primary distribution of its molecules into the inner monolayer of erythrocyte membrane, enriched with negatively charged phosphatidylserine [14].

It was interesting to investigate the peculiarities of ChP activity during hypertonic hemolysis of mammalian cells, which differ both by sensitivity to the hypertonic electrolytic media (see Fig.1), and by the plasmatic membrane content [9, 12].

In Fig.3 there are presented the dependencies of mammalian erythrocytes hypertonic hemolysis on ChP

турных и осмотических факторов окружающей среды связаны с особенностями структуры их плазматических мембран

Известно [3, 6], что ХП, являясь катионным производным фенотиазина, проявляет высокую антигемолитическую активность при гипертоническом гемолизе эритроцитов человека. Данное амфифильное соединение встраивается в эритроцитарную мембрану, вызывая быстрое изменение формы клеток [3, 11]. Наблюдаемый стоматоцитоз эритроцитов в присутствии ХП обусловлен преимущественным распределением его молекул во внутреннем монослое эритроцитарной мембраны, обогащенном отрицательно заряженным фосфатидилсерином [14].

Представляло интерес исследовать особенности проявления активности ХП при гипертоническом гемолизе клеток млекопитающих, различающихся как чувствительностью к гипертоническим электролитным средам (см. рис. 1), так и составом плазматических мембран [9, 12].

На рис. 3 представлены зависимости гипертонического гемолиза эритроцитов млекопитающих от концентрации ХП при 37°C. Добавление ХП в гипертоническую среду позволяет снизить уровень повреждения эритроцитов всех исследуемых животных. Если для клеток собаки и лошади минимальный уровень гипертонического гемолиза в присутствии ХП составляет примерно 10%, то для эритроцитов быка – 20%. Наибольшей чувствительностью к перенесению в среду, содержащую 4,0 М NaCl, при 37°C обладают клетки быка (рис.3). Следовательно, чем выше исходное повреждение эритроцитов, тем выше и уровень минимального гемолиза клеток в присутствии ХП.

Для всех исследуемых эритроцитов по мере увеличения концентрации ХП наблюдается снижение уровня гипертонического повреждения клеток. При достижении концентрации амфифила 60 мкМ кривые зависимости гипертонического гемолиза эритроцитов выходят на плато. Если для эритроцитов собаки и лошади оно хорошо выражено, то для бычьих – достаточно узкое. Рост уровня гемолиза клеток наблюдается при последующем повышении концентрации ХП. Граничная концентрация амфифила для эритроцитов быка – 80, лошади – 140 мкМ. Для эритроцитов собаки правая ветвь кривой (рис. 3) не выражена в диапазоне исследуемых концентраций (0-200 мкМ). Таким образом, эритроциты собаки способны выдерживать значительную нагрузку ХП даже при тех концентрациях амфифила, при которых наблюдается повышение гемолиза эритроцитов лошади и быка. Известно, что эритроциты собаки в отличие от эритроцитов других млекопитающих характеризуются высоким содержанием как суммарных фосфолипидов, так и холестерина [12].

concentration at 37°C. ChP adding into hypertonic medium allows to decrease the erythrocytes damage level of all investigated animals. For canine and equine cells the minimum hypertonic hemolysis level in the ChP presence is about 10%, but in the case of bovine erythrocytes it is about 20%. Bovine cells have the highest sensitivity to the removal into the medium, containing 4.0 M NaCl, at 37°C (Fig.3). Thus the bigger is initial erythrocytes damage, the higher is the level of minimum cells hemolysis in the ChP presence as well.

For all investigated erythrocytes, while an increase of ChP concentration, it is observed the decrease of the level of hypertonic cell damage. When reaching the amphiphile concentration 60 μM, the dependency curve of hypertonic erythrocytes hemolysis come to the plateau. If for canine and equine erythrocytes it is expressed, for bovine ones it is quite narrow. The increase of cell hemolysis level is observed during further increase of ChP concentration. Boundary concentration of amphiphile for bovine erythrocytes is 80, for equine it is 140 μM. For canine erythrocytes the right branch of the curve (Fig.3) is not expressed within the range of the investigated concentrations (0-200 μM). Thus canine erythrocytes are able to withstand with a considerable loading of ChP even at those concentrations of amphiphiles, under which the increase of bovine and equine erythrocytes hemolysis is observed. It is known that canine erythrocytes, comparing with those of other mammalian are characterized with a high content of both total phospholipid and cholesterol as well [12].

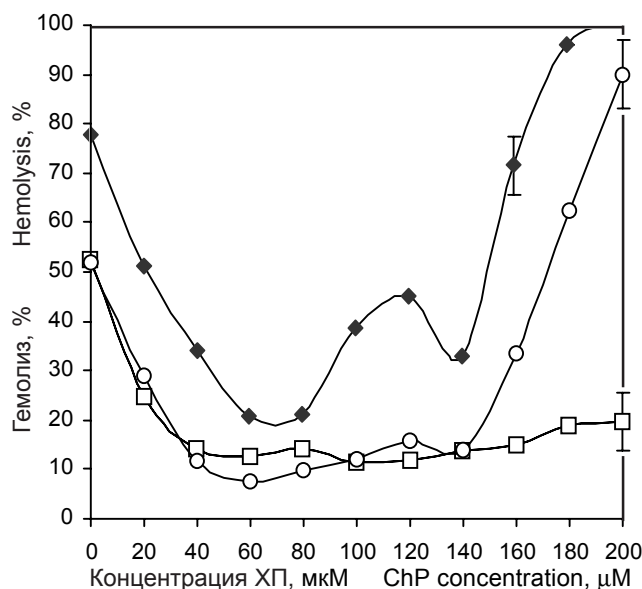


Рис. 3. Влияние хлорпромазина на уровень гипертонического (4,0 М NaCl) гемолиза эритроцитов собаки (□), лошади (○), быка (◆)(температура 37°C).

Fig. 3. Chlorpromazine effect on the level of hypertonic (4.0 M NaCl) canine (□), equine (○), bovine (◆) erythrocytes hemolysis (37°C).

Рис. 4. Значения максимальной антигемолитической активности и эффективных концентраций (показаны внутри столбцов в мкМ) хлорпромазина при гипертоническом (4,0 М NaCl) гемолизе эритроцитов быка, лошади и собаки (температура 37°C).

Fig. 4. Values of maximum antihemolytic activity and effective concentrations of ChP (are shown inside the columns in μM) at hypertonic hemolysis (4.0 M NaCl) of bovine, equine and canine erythrocytes (at 37°C).

Исходя из наших результатов, а также данных, полученных другими авторами [12], можно сделать вывод, что эритроциты собаки способны лучше адаптироваться как к изменению температурных и осмотических факторов окружающей среды, так и встраиванию большого количества экзогенных молекул ХП без деструктивных изменений эритроцитарной мембраны.

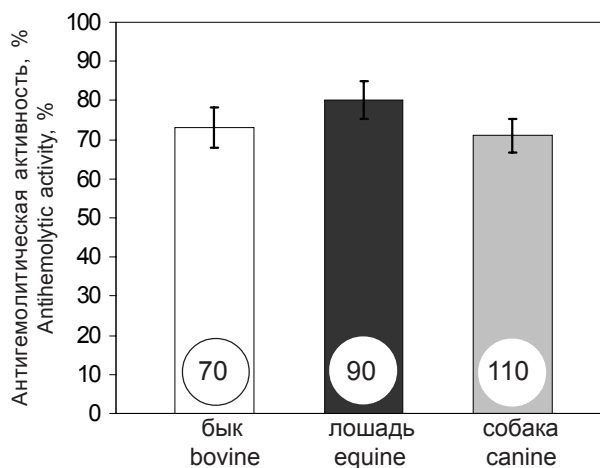
Для оценки эффективности ХП мы использовали понятие антигемолитической активности и эффективных концентраций вещества (рис. 4). Эффективная концентрация представляет собой среднее арифметическое значение эффективных концентраций ХП, соответствующих минимальному значению гемолиза эритроцитов (см. рис. 3).

Видно, что ХП проявляет высокую антигемолитическую активность (рис. 4). При разных значениях эффективных концентраций ХП уровни максимальной антигемолитической активности вещества для всех исследуемых эритроцитов примерно равны. Таким образом, несмотря на различный уровень исходного гипертонического повреждения эритроцитов и значений минимального гемолиза в присутствии ХП, его эффективность проявляется примерно в равной степени для клеток всех млекопитающих.

Выводы

Чувствительность эритроцитов млекопитающих к изменению температурно-осмотических факторов среды характеризуется видоспецифичностью. В условиях гипертонического стресса эритроцитов млекопитающих ХП проявляет высокую антигемолитическую активность, при этом диапазон эффективных концентраций амфифильного соединения различен и возрастает в ряду: бык, конь, собака.

Так как в основе гипертонического повреждения эритроцитов лежат процессы, связанные с нарушением проницаемости плазматической мембраны для ионов и, в конечном итоге, для молекул гемоглобина, можно полагать, что наблюдаемые различия в проявлении как температурной, так и осмотической чувствительности эритроцитов разных видов животных обусловлены видовыми особенностями строения и организации их эритроцитарных мембран.



Proceeding from our results, and from the data, obtained by other authors [12] we can conclude that canine erythrocytes are able of better adaptation both to the change in temperature and osmotic factors of environment, and to the building-in of a great number of exogenous ChP molecules without destructive changes in erythrocytes membrane.

To estimate the ChP activity we have used the definition of antihemolytic activity and an effective substance concentrations (Fig.4). Effective concentration is the arithmetic mean of effective ChP concentrations, corresponding to a minimum value of erythrocytes hemolysis (Fig.3).

It is seen that ChP shows a high hemolytic activity (Fig.4). At different values of effective ChP concentrations the levels of maximum antihemolytic activity of the substance for all investigated erythrocytes are practically equal. Thus despite various level of initial hypertonic erythrocytes damage and values of maximum hemolysis in the presence of ChP, its efficiency is manifested about in an equal extent for all mammalian cells.

Conclusions

Mammalian erythrocytes sensitivity to the change in temperature and osmotic factors of the medium is characterized by specificity for species. Under hypertonic stress of mammalian erythrocytes, ChP shows a high antihemolytic activity, in this case the range of effective concentrations of amphiphilic compound is various and increases in the row: canine, bovine, equine cells.

Since the processes are connected with the damage of permeability of plasmatic membrane for ions and for hemoglobin molecules, are in the base of erythrocytes hypertonic damage, it is possible to suppose, that observed differences in the development of both temperature and osmotic erythrocytes sensitivity of various animal species are conditioned by the species' peculiarities of building and organisation of their erythrocyte membrane.

Литература

1. *Бабийчук Л.А., Землянских Л.Г.* Оптимизация и преимущество безотмывочного метода криоконсервирования эритроцитов с ПЭО-1500 // Пробл. криобиологии.– 2001.– №1.– С. 35-41.
2. *Белоус А.М., Бондаренко В.А.* Структурные изменения биологических мембран при охлаждении.– Киев: Наук. думка, 1982.– 255 с.
3. *Кулешова Л.Г., Орлова Н.В., Шпакова Н.М.* Антигемолитическая и трансформирующая активность амфифильных соединений // Пробл. криобиологии.– 2001.– № 1.– С. 9-15.
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. *Поздняков В.В., Бондаренко В.А.* Взаимосвязь между исходными осмотическими условиями среды и чувствительностью эритроцитов к гипертоническому стрессу в 4.0 М NaCl // Криобиология.– 1989.– №1.– С. 47-49.
6. *Шпакова Н.М., Панталер Е.Р., Бондаренко В.А.* Антигемолитический эффект хлорпромазина при гиперосмотическом и холодовом шоке эритроцитов // Биохимия.– 1995.– Т. 60, №10.– С. 1624-1631.
7. *Amoako K.K., Goto Y., Misawa N. et al.* Interactions between *Fusobacterium necrophorum* hemolysin, erythrocytes and erythrocyte membranes // FEMS Microbiol. Lett.– 1997.– Vol.150, №1.– P. 101-106.
8. *Baker R.F., Clark L.J., Farooqui S., Kalra V.K.* Factors controlling phosphate-calcium-induced fusion for erythrocytes of several species // Biomed. Biochim. Acta.– 1987.– Vol.46, № 2-3.– P. S98-S102.
9. *Florin-Christensen J., Suarez C. E., Florin-Christensen M. et al.* A unique phospholipid organization in bovine erythrocyte membranes // Biochemistry.– 2001.– 98, № 14.– P. 7736-7741.
10. *Halperin J.A., Brugnara C., Van Ha T., Tosteson D.C.* Voltage-activated cation permeability in high-potassium but not low-potassium red blood cells // Am. J. Physiol.– 1990.– Vol.258, №6.– P. C1169-C1172.
11. *Isomaa B., Hagerstrand H., Paatero G.* Shape transformations induced by amphiphiles in erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta.– 1987.– Vol.809.– P. 93-103.
12. *Nelson G.J.* Composition of neutral lipids from erythrocytes of common mammals // J. Lipid Research.– 1967.– Vol.8.– P. 374-379.
13. *Salvioli G., Gaetti E., Panini R., et al.* Different resistance of mammalian red blood cells to hemolysis by bile salts // Lipids.– 1993.– Vol.28, №11.– P. 999-1003.
14. *Sheetz M.P., Singer S.J.* Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions // Proc. Nat. Acad. Sci.– 1974.– Vol.71.– P. 4457-4461.
15. *Yamanaka H., Shimatani S., Tanaka M. et al.* Susceptibility of erythrocytes from several animal species to *Vibrio vulnificus* hemolysin // FEMS Microbiol. Lett.– 1989.– Vol.52, N3.– P. 251-255.

References

1. *Babijchuk L.A., Zemyanskikh N.G.* Optimization and Advantages of Washing-out Method for Erythrocytes Cryopreservation with PEO-1500 // Problems of Cryobiology.– 2001.– N1.– P. 35-41.
2. *Belous A.M., Bondarenko V.A.* Structural Changes in Biological Membranes at Freezing.– Kiev: Nauk. Dumka, 1982.– 255 p.
3. *Kuleshova L.G., Orlova N.G., Shpakova N.M.* Antihemolytic and Transforming Activity of Amphiphilic Compounds // Problems of Cryobiology.– 2001.– N1.– P. 9-15.
4. *Pozdnyakov V.V.* The Effect of Composition and Medium Osmolarity on Erythrocytes' Stability to Osmotic and Temperature Shock: Auth.Thesis abstract, PhD (biology).– Kharkov, 1989.– 16 p.
5. *Pozdnyakov V.V., Bondarenko V.A.* The Interrelation between Initial Osmotic Medium Conditions and Erythrocyte Sensitivity to Hypertonic Stress in 4 M NaCl // Cryobiology.– 1989.– N1.– P. 47-49.
6. *Shpakova N.M., Pantaler E.R., Bondarenko V.A.* Antihemolytic Effect of Chlorpromazine under Hyperosmotic and Cold Shock of Erythrocytes // Biokhimiya.– 1995.– Vol. 60, N10.– P. 1624-1631.
7. *Amoako K.K., Goto Y., Misawa N. et al.* Interactions between *Fusobacterium necrophorum* hemolysin, erythrocytes and erythrocyte membranes // FEMS Microbiol. Lett.– 1997.– Vol.150, №1.– P. 101-106.
8. *Baker R.F., Clark L.J., Farooqui S., Kalra V.K.* Factors controlling phosphate-calcium-induced fusion for erythrocytes of several species // Biomed. Biochim. Acta.– 1987.– Vol.46, № 2-3.– P. S98-S102.
9. *Florin-Christensen J., Suarez C. E., Florin-Christensen M. et al.* A unique phospholipid organization in bovine erythrocyte membranes // Biochemistry.– 2001.– 98, № 14.– P. 7736-7741.
10. *Halperin J.A., Brugnara C., Van Ha T., Tosteson D.C.* Voltage-activated cation permeability in high-potassium but not low-potassium red blood cells // Am. J. Physiol.– 1990.– Vol.258, №6.– P. C1169-C1172.
11. *Isomaa B., Hagerstrand H., Paatero G.* Shape transformations induced by amphiphiles in erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta.– 1987.– Vol.809.– P. 93-103.
12. *Nelson G.J.* Composition of neutral lipids from erythrocytes of common mammals // J. Lipid Research.– 1967.– Vol.8.– P. 374-379.
13. *Salvioli G., Gaetti E., Panini R., et al.* Different resistance of mammalian red blood cells to hemolysis by bile salts // Lipids.– 1993.– Vol.28, №11.– P. 999-1003.
14. *Sheetz M.P., Singer S.J.* Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions // Proc. Nat. Acad. Sci.– 1974.– Vol.71.– P. 4457-4461.
15. *Yamanaka H., Shimatani S., Tanaka M. et al.* Susceptibility of erythrocytes from several animal species to *Vibrio vulnificus* hemolysin // FEMS Microbiol. Lett.– 1989.– Vol.52, N3.– P. 251-255.

Accepted in 27.04.2004

Поступила 27.04.2004