

Модифицирующее влияние амфипатических соединений на чувствительность эритроцитов к изменению осмотических и температурных условий среды

Ф. АБУ-АЛЬ АСАЛЬ, С.В. МЕЛИХОВА, В.А. БОНДАРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Modifying Effect of Amphipatic Compounds on Erythrocyte Sensitivity to the Change in the Medium Osmotic and Temperature Conditions

ABUALASAL F., MELIKHOVA S.V., BONDARENKO V.A.

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

Исследовали влияние амфипатических соединений на чувствительность эритроцитов к гипертоническому шоку при переносе в 4,0 М NaCl и гипертоническому криогемолизу при охлаждении от 37 до 0°C. Установлено, что независимо от природы действующего агента его влияние на сохранность клеток при гипертоническом гемоллизе и гипотоническом шоке носит сходный характер. При гипертоническом шоке для каждого исследуемого соединения наблюдается область концентраций, при которой защитный эффект является максимальным. При высоких концентрациях амфипата в условиях гипертонии наблюдается прогемолитический эффект соединения. При переносе в 4,0 М NaCl защитный эффект амфипатов проявляется также в изменении температурной зависимости чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку.

Ключевые слова: эритроциты, амфипатические соединения, гипертонический шок, гипертонический криогемолиз.

Досліджували вплив амфіпатичних сполук на чутливість еритроцитів до гіпертонічного шоку при переносі в 4,0 М NaCl і гіпертонічному криогемолізу при охолодженні від 37 до 0°C. Установлено, що незалежно від природи діючого агента його вплив на схоронність клітин при гіпертонічному гемолізі і гіпотонічному шоку носить подібний характер. В умовах гіпертонічного шоку для кожної досліджуваної сполуки спостерігається область концентрацій, при яких захисний ефект є максимальним. При більш високих концентраціях речовини в умовах гіпертонії починає виявлятися прогемолітичний ефект сполуки. При переносі в 4,0 М NaCl захисний ефект амфіпатів виявляється також у зміні температурної залежності чутливості еритроцитів до гіпертонічного шоку.

Ключові слова: еритроцити, амфіпатичні сполуки, гіпертонічний шок, гіпертонічний криогемоліз.

The effect of amphipatic compounds on the erythrocyte sensitivity to hypertonic stress when transferring into 4.0 M NaCl and hypertonic cryohemolysis under cooling from 37 down to 0°C was investigated. It was established, that independently on the nature of the acting agent its effect on cell preservation under hypertonic hemolysis and hypertonic stress was the similar. The concentration range, where the protective effect is maximum, is manifested under hypertonic stress for each studied compound. Under high amphipate concentrations under hypertonic conditions the prohemolytic effect of the compound is noted. When transferring into 4.0 M NaCl the protective effect of amphipate is also manifested in a change of temperature dependence of erythrocyte susceptibility to hypertonic stress.

Key-words: erythrocytes, amphipatic compounds, hypertonic stress, hypertonic cryohemolysis.

В настоящее время известно, что многие химические агенты (амфифильные соединения, анестетики, двухвалентные ионы, алкилирующие реагенты и др.) способны оказать существенное влияние на чувствительность клеток к изменению температурных и осмотических условий среды [1,5]. Важную роль при этом играет характер влияния модификаторов на ту или иную систему клетки. В частности, устойчивость клеток к гипертоническому криогемолизу и гипертоническому шоку может повыситься после взаимодействия модифицирующего фактора с компонентами как цитоскелета, так и мембраны [7]. В последнем случае протектирующий эффект может иметь как чисто структурную основу, то

Nowadays it is known, that numerous chemical agents (amphiphilic compounds, anesthetics, bivalent ions, alkylating reagents etc.) are capable to cause a considerable effect on cell susceptibility to a change in the temperature and osmotic conditions of the medium [1, 5]. The effect character of modifiers on that or this cell system plays an important role. In particular, the cell resistance to hypertonic cryohemolysis and hypertonic stress can increase after the modifying factor interaction with both cytoskeletal and membrane components [7]. In the latter case, the protecting effect can be of both structural base, i.e. can be provided by the building in of molecules modifiers to the lipid bilayer, and a functional one, related, for example, to the change in the character of

Адрес для корреспонденции: Ф. Абу-Аль Асаль. Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 7720135, факс: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Abualasal F., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7720135 fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

есть обеспечиваться встраиванием молекул модификаторов в липидный бислой, так и функциональную, связанную, например, с изменением характера функционирования систем ионного транспорта [8]. Предполагается, что общей основой влияния на клетки указанных модификаторов является ограничение структурных перестроек мембраны и цитоскелета [6,7].

Эритроцит – удобный объект, позволяющий при положительных температурах моделировать процессы, вызывающие повреждения клеток при снижении температуры и изменении осмолярности среды. Наиболее изучены гипертонический криогемолиз, постгипертонический гемолиз и гипертонический шок (повреждение, развивающееся при переносе клеток в сильно гипертонический раствор, например, 4,0 М NaCl) [3]. Для каждого из указанных типов воздействия могут иметь место те или иные комбинации действующих факторов, например, когда изменения температуры и осмолярности среды сочетаются с действием определенного химического модификатора. Соответственно представляет интерес выяснить, как проявляется влияние химических агентов при том или ином типе воздействия.

Материалы и методы

Для исследования использовали эритроциты, полученные из донорской крови, заготовленной на глюцицировом консерванте. После удаления плазмы эритроциты дважды отмывали центрифугированием при 1500 г в течение 3-х минут в 10-кратном объеме физиологического раствора (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатного буфера, pH 7,4) и хранили в виде плотного осадка не более 2-х часов при температуре 0°C. Лейкоцитарную пленку удаляли аспирацией. Все использованные в работе среды готовили на 0,01 моль/л фосфатном буфере, pH 7,4.

В работе были использованы амфифильные соединения: децил-β, D-глюкопиранозид (DGP), гексил-β, D-глюкопиранозид (HGP), октил-β, D-глюкопиранозид (OGP), додецил-β, D-мальтозид (DDM), хлорпромазин гидрохлорид фирмы “Calbiochem”, а также реактивы отечественного производства квалификации “хч” и “чда”.

Гипертонический шок эритроцитов моделировали по следующей методике. По 50 мкл осадка эритроцитов переносили в 0,5 мл раствора NaCl (0,15-1,0 моль/л) при заданной температуре и инкубировали 2 мин (этап предварительной инкубации). Затем из каждой пробы по 50 мкл суспензии эритроцитов переносили в 1,0 мл раствора, содержащего 4,0 моль/л NaCl (в норме и в условиях обработки амфипатическим соединением).

the ion transport system functioning [8]. General base of the effect on cells of the mentioned modifiers is assumed to be the limitation of the membrane and cytoskeleton structural rearrangements [6, 7].

The erythrocyte is a convenient object, allowing under positive temperatures to model the processes, evoking the cell damages during the temperature decrease and a change in the medium osmolarity. Hypertonic cryohemolysis, posthypertonic hemolysis and hypertonic stress (the damage, developing when transferring cells into a strong hypertonic solution, for example, 4.0 M NaCl) are the most studied [3]. Those or these combinations of the acting factors, for example, when the changes in the temperature and medium osmolarity are combined with the effect of the certain chemical modifier, can take place for each of the mentioned effect types. Correspondingly, the elucidation of the fact, how the effect of chemical agents is manifested under this or that effect type, is of the interest.

Materials and methods

For the investigation we used the erythrocytes, obtained from donor's blood, prepared on a glucicyr preservative. After plasm removing, the erythromass was twice washed-out by centrifuging under 1500 g during 3 min in 10-fold volume of physiological solution (0.15 mol/l of NaCl, 0.01 mol/l of phosphate buffer, pH 7.4) and was stored as a dense sediment not more than 2 hrs under 0°C. Leukocyte membrane was removed by aspiration. All the media, used in the work, were prepared in 0.01 mol/l phosphate buffer, pH 7.4.

The following amphiphilic compounds were used in the work: decyl-β, D-glucopyranoside (DGP), hexyl-β, D-glucopyranoside (HGP), octyl-β, D-glucopyranoside (OGP), dodecyl-β, D-maltoside (DDM), chlorpromazine hydrochloride of “Calbiochem” Company, as well as the home manufactured reagents of the “chemically pure” and “pure for analysis” grade.

The erythrocyte hypertonic stress was modelled according to the following methods. By 50 μl of erythrocyte sediment were transferred into 0.5 ml of NaCl solution (0.15-1.0 mol/l) under the fixed temperature and incubated for 2 min (the stage of preliminary incubation). Afterwards from each sample one transferred by 50 μl of erythrocyte suspension into 1.0 ml of solution, containing 4.0 mol/l of NaCl (in the norm and under conditions of treatment with amphipatic compound).

One transferred 50 μl of erythrocyte sediment into 0.5 ml of NaCl solution (1.2 mol/l) for 10 min under 37°C temperature for modeling the hypertonic cryohemolysis. Then 50 μl of erythrocyte suspension from this sample were put into 1.0 ml of NaCl solution with the same tonicity, being under 0°C for 10 min (in the norm and under conditions of treatment with

Для моделирования гипертонического криогемолиза 50 мкл осадка эритроцитов переносили в 0,5 мл раствора NaCl (1,2 моль/л) на 10 мин при температуре 37°C. Затем из этой пробы переносили 50 мкл суспензии эритроцитов в 1,0 мл раствора NaCl той же тоничности, находящегося при температуре 0°C, на 10 мин (в норме и в условиях обработки амфипатическим соединением). Гипотонический шок осуществляли путем переноса 50 мкл суспензии в 1 мл 0,058 моль/л NaCl при конечном гематокрите 0,4%. Исследуемое вещество добавляли в литическую среду перед внесением клеток.

Клетки осаждали центрифугированием в течение 3-х минут при 1500 g. Содержание вышедшего в супернатант гемоглобина определяли спектрофотометрическим способом на СФ-4А с проточной кюветой при длине волны 543 нм. За 100% принимали поглощение пробы, в которую добавляли детергент тритон X-100 в концентрации 0,1%. Каждый эксперимент повторяли не менее 6 раз в двух параллельных пробах. Сохранность клеток выражали как разницу между 100%-м гемолизом и гемолизом в эксперименте для каждой экспериментальной точки.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены данные, отражающие изменение сохранности эритроцитов в условиях гипотонического и гипертонического шока, а также гипертонического криогемолиза при действии амфипатических агентов из группы β -D-глюкопиранозидов. Указанные соединения различаются по длине алифатической боковой цепи, что влияет на такие параметры, как гидрофобность молекулы и коэффициент распределения между полярной и гидрофобной фазами [4]. В данном случае результирующим параметром можно считать диапазон эффективных концентраций вещества, при которых оно обеспечивает максимальную защиту клеток при осмотическом и температурном воздействиях [2]. Для всех 3-х исследуемых веществ характерен практически одинаковый защитный эффект в условиях гипотонического гемолиза и гипертонического криогемолиза эритроцитов (рис. 1, кривые 1, 3 соответственно). Иная картина наблюдается при гипертоническом шоке (рис. 1, кривая 2). Видно, что в присутствии каждого исследуемого вещества существует граница его концентраций, при переходе через которую защитная эффективность уменьшается. Это позволяет предположить, что гипертонический стресс индуцирует изменения в мембране, вызванные селективным включением молекул амфипата в участки мембраны с более высокой текучестью с достижением концентраций, при

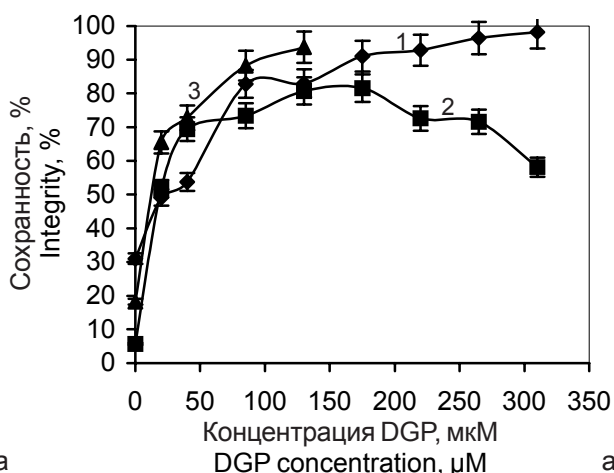
amphipatic compound). Hypotonic stress was performed by transferring 50 μ l of suspension into 1 ml of 0.058 mol/l of NaCl at the final hematocrit of 0.4%. The studied substance was added into a lytic medium before cell introduction.

Cells were precipitated by centrifuging during 3 min at 1500g. The content of the released into supernatant hemoglobin was spectrophotometrically determined by 1 way in SF-4A with a flow dish at the 543 nm wave length. The sample absorption, where one added the Triton X-100 detergent in 0.1% concentration, was taken for 100%. Each experiment was repeated not less than 5 times in two parallel samples. The cell integrity was expressed as the difference between 100% hemolysis and the one in the experiment for each experimental point.

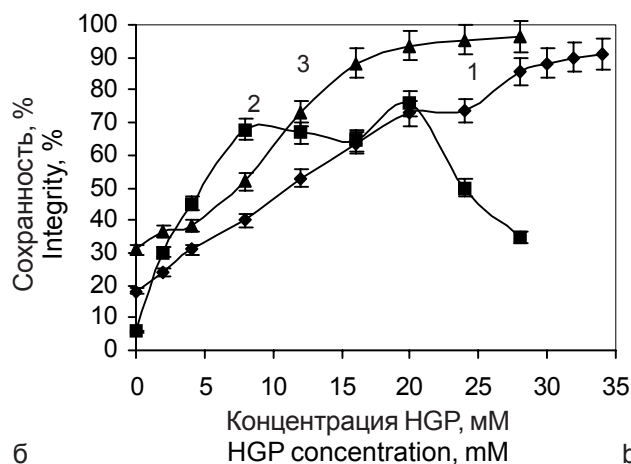
Results and discussion

The Fig.1 shows the data, reflecting the change in the erythrocyte integrity under conditions of hypotonic and hypertonic stresses, as well as hypertonic cryohemolysis under the effect of amphipatic agents from the β -D-glucopyranoside group. The mentioned compounds differ by the length of aliphatic side chain, that affects such parameters, as a molecule hydrophoby and the distribution coefficient between the polar and hydrophobic phases [4]. In this case as a resulting parameter we can consider the range of efficient substance concentrations, when it provides the maximum cell protection under osmotic and temperature effects [2]. Practically the same protective effect under conditions of the erythrocyte hypotonic hemolysis and hypertonic cryohemolysis is typical for all 3 studied substances (Fig. 1, curves 1, 3, correspondingly). Another picture is observed during hypertonic stress (Fig. 1, curve 2). It is obvious, that at the presence of each studied substance there is the limit of its concentration, transferring which the protective effect reduces. This allows to suppose, that hypertonic stress induces the changes in a membrane, evoked by a selective inclusion of amphipate molecules into the membrane sites with higher fluidity with achieving such concentrations, when the bilayer structure is destabilised. If we assume, that the strong hypertonic stress, accompanying by a decrease in cell volume, change in its shape and the membrane deformation, is the factor, contributing to the separation of lipid phases in the membrane plane, one can consider namely the concentrating of amphipate molecules in the bilayer sites with a high fluidity as the instability factor under these conditions.

The Fig. 1 demonstrates, that the hypertonia effect is most of all manifested at DGP, and the least at HGP. At the same time the mentioned differences can be considered as the relative ones, because the general tendency, observed under the amphipate effect points



а



б

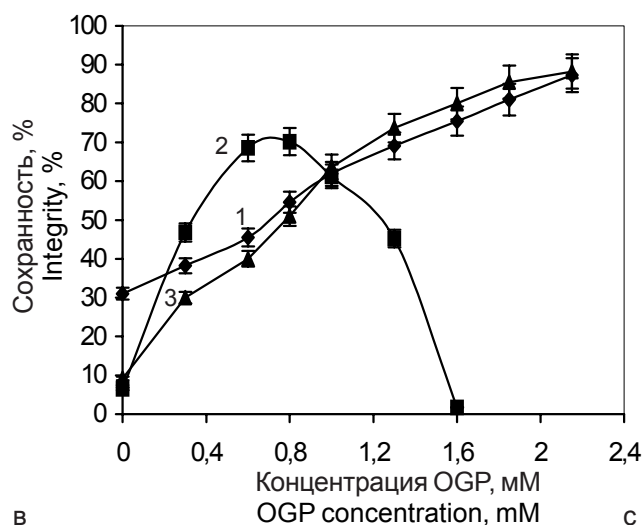
Рис. 1. Влияние DGP (а), HGP (б), OGP (в) на сохранность эритроцитов в условиях: 1 – гипотонического шока; 2 – гипертонического шока; 3 – гипертонического криогемолиза.

Fig. 1. The effect of DGP (a); HGP (b); OGP (c) on erythrocyte integrity under conditions of: 1 – hypotonic stress; 2 – hypertonic stress; 3 – hypertonic cryohemolysis.

которых структура бислоя дестабилизируется. Если принять, что сильный гипертонический стресс, сопровождающийся уменьшением объема клетки, изменением ее формы и деформацией мембраны, является фактором, способствующим разделению липидных фаз в плоскости мембраны, тогда фактором нестабильности в этих условиях можно считать именно концентрирование молекул амфипата в участках бислоя с высокой текучестью.

Из рис. 1 видно, что больше всего эффект гипертонии проявляется при DGP, а наименьше – при HGP. В то же время указанные различия можно рассматривать как относительные, так как общая тенденция, наблюдаемая при действии амфипатов, указывает на снижение защитной эффективности амфипатического агента при гипертоническом шоке по мере увеличения его концентрации. Важно отметить связь между абсолютной эффективностью амфипата (которую можно оценить по близости количественных значений сохранности эритроцитов при всех 3-х режимах воздействия на клетки) и крутизной нисходящего участка кривой сохранности клеток в условиях гипертонического шока. Для DGP, характеризующегося более низкой абсолютной эффективностью по сравнению с другими амфипатами, крутизна нисходящей ветви кривой сохранности при гипертоническом шоке является наиболее высокой. Из этого следует, что защитная эффективность амфипата может быть определена по его способности защищать клетки в условиях гипертонического криогемолиза.

Для вариантов температурно-осмотического воздействия (рис. 1) характерно наличие двух областей гипертонических концентраций NaCl (1,20



в

to a decrease in a protective efficiency of amphipatic agent under hypertonic stress with an increase in its concentration. It is important to note the relationship between the absolute amphipate efficiency (which can be estimated by the proximity of quantitative values of erythrocyte integrity under all 3 regimens of effect on cells) and the slope of descending curve site of cell integrity under hypertonic stress conditions. For DGP, which is characterised by lower absolute efficiency in comparison with other amphipates, the slope of the integrity descending curve under hypertonic stress is the highest. It follows from this, that the amphipate protective efficiency can be determined by its capability to protect cells under hypertonic cryohemolysis conditions.

For the variants of temperature and osmotic effect (Fig. 1) it is characterised the presence of two areas of NaCl hypertonic concentrations (1.20 and 4.0 M, relating in the first case to a cell damage under hypertonic cryohemolysis conditions, and in the second one to a hypertonic stress). At the same time in an intermediate range of NaCl concentrations the cell damage mechanism can be of combined character, i.e. can comprise both the osmotic and temperature

и 4,0 М, относящихся в первом случае к повреждению клеток в условиях гипертонического криогемолиза, а во втором – гипертонического шока). В то же время в промежуточной области концентраций NaCl механизм повреждения клеток может носить комплексный характер, то есть включать как собственно осмотическую, так и температурную компоненту повреждения. Соответственно более сложным в этих условиях является защитный эффект амфипатических соединений.

На рис. 2 представлены данные о влиянии 2-х амфипатов: DDM ($2,0 \times 10^{-5}$ моль/л) и хлорпромазина ($3,5 \times 10^{-4}$ моль/л) на чувствительность эритроцитов к охлаждению от 37 до 0°C в присутствии NaCl в интервале концентраций 0,75-2,25 М. В области концентраций электролита вблизи 1,25 М сохранность клеток минимальна и она возрастает как при более низких, так и при более высоких значениях концентрации NaCl. Иной характер зависимости между сохранностью эритроцитов и концентрацией электролита в среде наблюдается в присутствии амфипатов (рис. 2, кривые 2, 3). Видно, что при действии хлорпромазина и DDM кривые сохранности для интервала концентраций NaCl 1,25-2,25 М практически параллельны друг другу. Это указывает, что несмотря на различия в химической структуре исследуемых веществ (DDM включает боковую алифатическую цепь, состоящую из 12 углеродных атомов), механизм их защитного действия на клетки в указанных условиях, вероятно, является одинаковым. Увеличение сохранности эритроцитов при охлаждении в присутствии 1,75-2,25 М NaCl свидетельствует о том, что повышенная осмолярность среды при температурном сдвиге может быть фактором, снижающим чувствительность клеток к изменению температуры.

Из рис.3 видно, что как при переносе клеток при температурах 0, 10, 20, 35°C, так и при переносе из 0°C в каждую из указанных температур, сохранность клеток в контроле максимальна при 0°C. По мере повышения температуры сохранность эритроцитов снижается и достигает минимума при 35°C. Следует отметить, что независимо от условий переноса клеток в гипертонический раствор их чувствительность к переносу в 4,0 М NaCl зависит также от исходных осмотических условий, в которых они находились. Сохранность эритроцитов минимальна в условиях как исходной изотонии, так и гипертонии, когда концентрация NaCl в среде становится выше 0,75 М.

Наблюдаемая на рис. 3 (а, в) температурная зависимость может быть объяснена с учетом баланса влияния двух факторов: первый – вероятность инициации мембранного дефекта на

component of a damage. Correspondingly, the protective effect of amphipate compounds is more complicated under these conditions.

The Fig. 2 presents the data about the effect of two amphipates: DDM (2.0×10^{-5} mol/l) and chlorpromazine (3.5×10^{-4} mol/l) on the erythrocyte sensitivity to cooling from 37 down to 0°C at the NaCl presence within the 0.75-2.25 M concentration range. Within the area of the electrolyte concentrations close to 1.25 M the cell integrity is minimum and it increases both under lower and higher values of NaCl concentrations. Another character of the dependency between the erythrocyte integrity and the electrolyte concentration in the medium is observed at the amphipate presence (Fig. 2, curves 2,3). It is seen, that under the chlorpromazine and DDM effect the integrity curves for the NaCl concentration range of 1.25-2.25 M are quite parallel to each other. This indicates, to the fact, that in spite of the differences in chemical structure of studied substances (DDM includes a side aliphatic chain, comprising 12 carbon atoms), the mechanism of their protective effect on cells under these conditions is probably the same. An increase in erythrocyte integrity during cooling at the presence of 1.75-2.25 M NaCl testifies to the fact, that an increased osmolarity of the medium under temperature shift can be the factor, reducing the cell sensitivity to the temperature change.

The Fig. 3 shows, that during the cell transfer at 0,

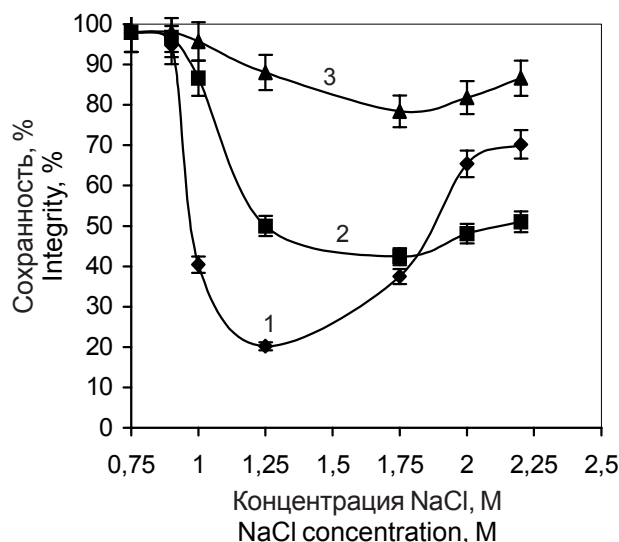


Рис. 2. Влияние DDM и хлорпромазина на сохранность эритроцитов при гипертоническом криогемолизе (37-0°C). 1 – контроль; 2 - DDM; 3 – хлорпромазин.

Fig. 2. Effect of DDM and chlorpromazine on erythrocyte integrity under hypertonic cryohemolysis (37-0°C). 1 – the control; 2 - DDM; 3 – chlorpromazine.

10, 20, 25°C, as well as during the transfer from 0°C into each of the mentioned temperatures, the cell integrity in the control is maximum at 0°C. With the

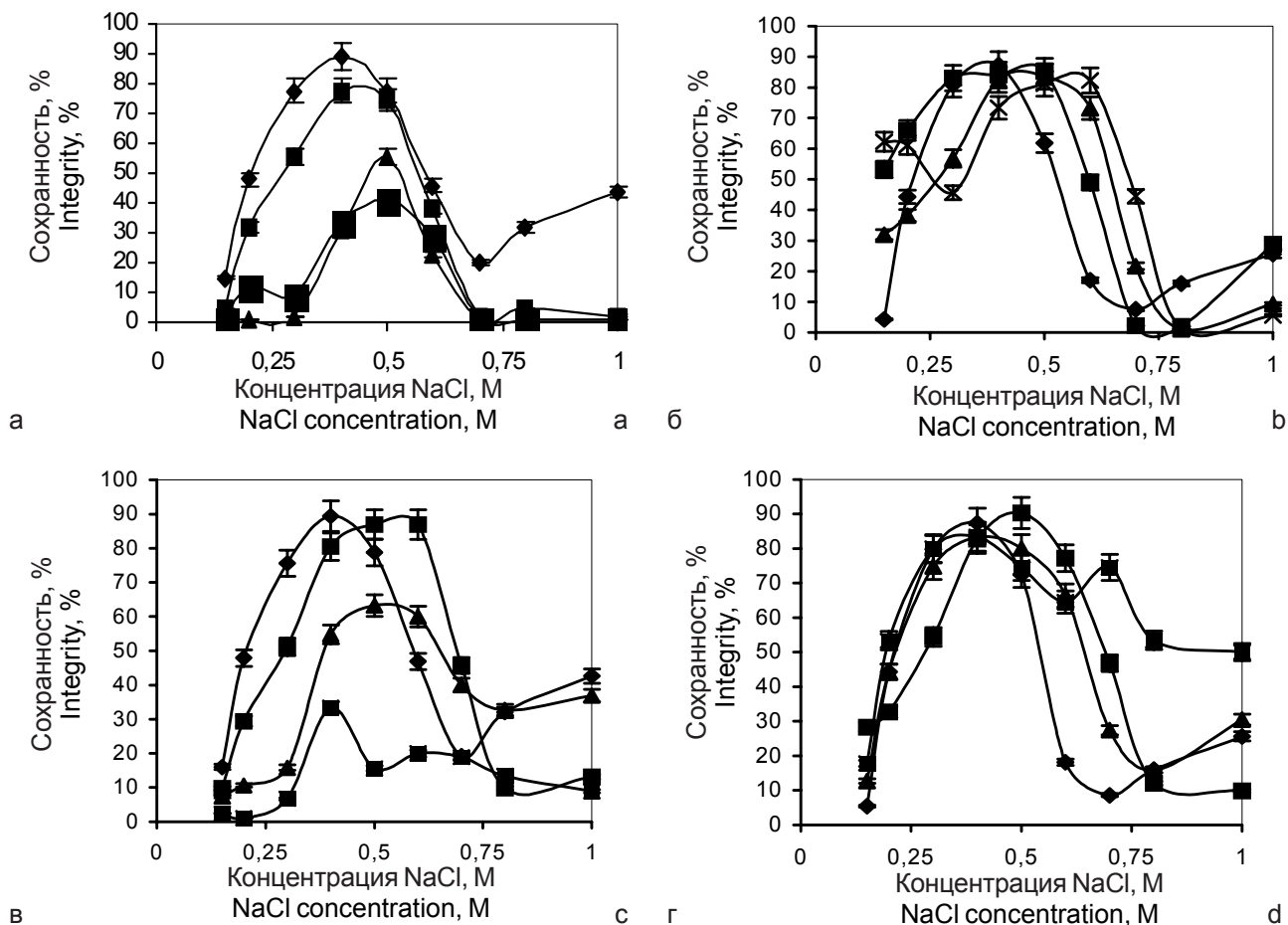


Рис. 3. Влияние DDM ($7,5 \times 10^{-6}$ M) на сохранность эритроцитов, исходно инкубируемых в растворах NaCl в интервале 0,15-1,0 M при переносе в 4,0 M NaCl при различных температурных режимах: а – необработанные эритроциты, температура конечного раствора (4,0 M NaCl) соответствует температуре начальной инкубации; б – то же после обработки DDM; в – необработанные эритроциты, температура начального раствора 0°C, конечного 0-35°C; г – то же после обработки DDM. ◆ – 0°C; ■ – 10°C; ▲ – 20°C; X – 35°C.

Fig. 3. DDM effect (7.5×10^{-6} M) on erythrocyte integrity, initially incubated in NaCl solutions within the range of 0.15-1.0 M when transferring into 4.0 M NaCl under different temperature regimens: a – non-treated erythrocytes, the temperature of final solution (4.0 M NaCl) corresponds to that of initial incubation; б – the same after treatment with DDM; в – non-treated erythrocytes, temperature of initial solution is 0°C, 0-35°C for final one; д – the same after DDM treatment.

◆ – 0°C; ■ – 10°C; ▲ – 20°C; X – 35°C.

начальном этапе воздействия на клетки, второй – вероятность его замыкания на конечном этапе. В зависимости от начальных и конечных температурных условий вероятность инициации и замыкания дефекта может изменяться. Иными словами, при определенной температуре преобладает влияние факторов, способствующих инициации, и слабо проявляется влияние факторов, способствующих замыканию, а при другой температуре может иметь место обратная ситуация. Очевидно, при высоком уровне сохранности клеток баланс влияния указанных факторов сдвигается в сторону низкой вероятности инициации дефектов и высокой вероятности их замыкания.

Данные, представленные на рис. 3 б, г, указывают на важную особенность влияния DDM на сохранность эритроцитов в условиях гипертонического шока этот амфипат практически

temperature increase the erythrocyte integrity reduces and achieves the minimum at 35°C. It should be noted, that independently on the conditions of cell transfer into hypertonic solution the cell sensitivity to the transfer into 4.0 M NaCl also depends on the initial osmotic conditions, where they are placed. The erythrocyte integrity is minimum both under initial isotonic and hypertonic conditions, when the NaCl concentration becomes higher than 0.75 M.

The observed in the Fig. 3, a, б temperature dependency can be explained taking into account the balance of the influence of two factors: the probability of membrane defect initiation at the initial stage of the effect on cells and that of its closure at the final one. Depending on the initial and final temperature conditions the probability of the defect initiation and closing can be changed. By other words under certain temperature there is the predomination of the factors, contributing to the initiation, and vice versa, there is a

устраняет температурную зависимость чувствительности клеток к переносу в 4,0 М NaCl как в изотермическом, так и неизотермическом режимах. В случае нормальных эритроцитов (рис. 3, а, в) сохранность клеток определяется конечной температурой (4,0 М NaCl) независимо от начальной. Если учитывать, что максимальная сохранность эритроцитов наблюдается после их переноса из промежуточной области концентраций NaCl (0,40-0,50 М), тогда можно предположить, что температура определяет время жизни стабильного состояния клеток, формирующегося в этой области NaCl и обеспечивающего их устойчивость в переходной фазе быстрого изменения условий среды при переносе в 4,0 М NaCl. При 0°C время жизни стабильного состояния клеток может возрастать в степени, достаточной для предотвращения их лизиса в переходной фазе быстрого изменения осмотических условий среды (при гипертоническом шоке). DDM способствует сохранению стабильного состояния независимо от температурного режима переноса клеток (рис. 3, б, г).

Выводы

Амфипатические соединения по-разному оказывают защитный эффект на эритроциты в условиях гипертонического криогемолиза и гипертонического шока. При гипертоническом шоке наблюдается критическая область концентраций амфипатов, при переходе через которую начинает проявлять себя прогемолитическое действие соединения. В то же время в условиях гипертонического криогемолиза характер влияния амфипатов на эритроциты носит сходный характер с таковым при осмотическом шоке, развивающемся при переносе клеток в гипотонический раствор электролита. При переносе в 4,0 М NaCl амфипаты изменяют температурную зависимость чувствительности эритроцитов к осмотическому воздействию.

Литература

1. Дунаевская О.И., Шпакова Н.М., Бондаренко В.А. Гиперосмотический стресс эритроцитов и антигемолитическая активность трифторперазина // Пробл. криобиологии.– 1997.– №4.– С. 28-33.
2. Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Влияние амфифильных соединений на чувствительность частично обезвоженных эритроцитов к гипертоническому стрессу // Пробл. криобиологии.– 2003.– №1.– С.59-64.
3. 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.
4. Сынчикова О.П. Влияние амфифильных соединений на

slight manifestation of the factor effect, contributing to a closure, during the temperature change the reverse situation can occur. At a high level of cell integrity the balance of the effect of the mentioned factors is evidently shifted towards the side of low probability of the defect initiation and a high probability of their closing.

The data of the Fig. 3, b, d indicate to the important peculiarity of DDM effect on the erythrocyte integrity under hypertonic stress conditions: this amphipate practically removes the temperature dependency of cell sensitivity to the transfer into 4.0 M NaCl both in isothermic and non-isothermic regimens. For the case of normal erythrocytes (Fig. 3, a, b) the cell integrity is determined by the final temperature (4.0 M NaCl) independently on the initial one. If we take into account the fact, that the maximum erythrocyte integrity is observed after their transfer from the intermediate range of NaCl concentrations (0.40-0.50 M), we can assume, that the temperature determines the life time for the cell stable state, that forms within this NaCl range, and provides their resistance in a transitional phase of a rapid change in the medium conditions when transferring into 4.0 M NaCl. At 0°C the life time of the cell stable state can increase in the degree, sufficient for preventing their lysis in a transitional phase of a rapid change in the medium osmotic conditions (under hypertonic stress). DDM contributes to the integrity of a stable state independently on the temperature regimen of cell transfer (Fig. 3, b, d).

Conclusions

Amphipatic compounds differently manifest their protective effect to erythrocytes under hypertonic cryohemolysis and hypertonic stress conditions. Under hypertonic stress there is observed a critical area of amphipate concentrations, transferring which the compound prohemolytic effect begins to manifest itself. At the same time under conditions of hypertonic cryohemolysis the character of amphipate effect to erythrocytes has the similar character with that, being under osmotic stress, which develops when transferring cells into the electrolyte hypotonic solution. The amphipates change their temperature dependence of erythrocyte sensitivity to osmotic effect when transferring into 4.0 M NaCl.

References

1. Dunaevskaya O.I., Shpakova N.M., Bondarenko V.A. Hyperosmotic stress of red cells and antihemolytic activity of trifluoperazine // Problems of Cryobiology.– 1997.– N4.– P. 28-33.
2. Orlova N.V., Shpakova N.M. Effect of amphiphilic compounds on the susceptibility of partially dehydrated erythrocytes to hypertonic stress // Problems of Cryobiology.– 2003.– N1.– P. 59-64.

- гипертонический гемолиз эритроцитов: Дис...канд.биол. наук.– Харьков, 2003.– С. 149.
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. *Lieber M.R., Lange G., Weinstein R.S., Steck T.L.* Interaction of chlorpromazine with the human erythrocyte membrane // J. Biol. Chem.– 1984.– Vol. 259.– N14.– P. 9225-9235.
 7. *Minetti M., Di Stasi A.M.* Involvement of erythrocyte skeletal proteins in the modulation of membrane fluidity by phenothiazines // Biochemistry.– 1987.– Vol. 26, N25.– P. 8133-8138.
 8. *Motais R., Baroin A., Motais A., Baldy S.* Inhibition of anion and glucose permeabilities by anesthetics in erythrocytes. The mechanisms of action of positively and negatively charged drugs // Biochim. Biophys. Acta.– 1980.– Vol. 599, N2.– P. 673-686.
 3. *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.
 4. *Synchikova O.P.* The effect of amphiphilic compounds on hypertonic hemolysis of erythrocytes: Thesis of the candidate of biological sciences.– Kharkov.– 2003.– 149 p.
 5. *Shpakova N.M., Pantaler E.R., Bondarenko V.A.* Antihemolytic effect of chlorpromazine under hyperosmotic and cold shock of erythrocytes // Biokhimiya.– 1995.– 60, N10.– P. 1624-1631.
 6. *Lieber M.R., Lange G., Weinstein R.S., Steck T.L.* Interaction of chlorpromazine with the human erythrocyte membrane // J. Biol. Chem.– 1984.– Vol. 259.– N14.– P. 9225-9235.
 7. *Minetti M., Di Stasi A.M.* Involvement of erythrocyte skeletal proteins in the modulation of membrane fluidity by phenothiazines // Biochemistry.– 1987.– Vol. 26, N25.– P. 8133-8138.
 8. *Motais R., Baroin A., Motais A., Baldy S.* Inhibition of anion and glucose permeabilities by anesthetics in erythrocytes. The mechanisms of action of positively and negatively charged drugs // Biochim. Biophys. Acta.– 1980.– Vol. 599, N2.– P. 673-686.

Поступила 05.08.2003

Accepted in 05.08.2003