

## Влияние инкубации эритроцитов лошади при 49°C на эффективность амфифильных веществ в условиях гипертонического стресса

UDC 57.043:591.111.1

N.M. SHPAKOVA\*, N.A. PISARENKO, N.V. ORLOVA

## Effect of Equine Erythrocyte Incubation at 49°C on Amphiphilic Substance Efficiency Under Hypertonic Stress Conditions

Исследовано влияние амфифильных соединений (C10, ДМ, ТФП) и тепловой предобработки эритроцитов лошади (49°C) на чувствительность клеток к гипертоническому шоку (4,0 М NaCl). Показано, что все амфифильные соединения снижают уровень гипертонического гемолиза эритроцитов лошади. Инкубация эритроцитов при 49°C, приводящая к денатурации спектрина, уменьшает уровень гипертонического повреждения эритроцитов при 37 и повышает при 0°C. В указанных условиях наблюдается снижение эффективности всех исследуемых амфифильных соединений.

**Ключевые слова:** эритроциты лошади, гипертонический гемолиз, спектрин, амфифильные соединения.

Досліджено вплив амфифільних сполук (C10, ДМ, ТФП) та теплової обробки еритроцитів коня (49°C) на чутливість клітин до гіпертонічного шоку (4,0 М NaCl). Показано, що всі амфифільні сполуки зменшують рівень гіпертонічного гемолізу еритроцитів коня. Інкубація еритроцитів при 49°C, що призводить до денатурації спектрину, зменшує рівень гіпертонічного пошкодження еритроцитів при 37 та підвищує при 0°C. В зазначених умовах спостерігається зниження ефективності усіх досліджуваних амфифільних сполук.

**Ключові слова:** еритроцити коня, гіпертонічний гемолиз, спектрин, амфифільні сполуки.

The effect of amphiphilic compounds (C10, DM, TFP) and heat preliminary treatment of equine erythrocytes (49°C) on cell sensitivity to hypertonic stress (4.0 M NaCl) has been investigated. All amphiphilic compounds were shown as reducing the level of hypertonic hemolysis in equine erythrocytes. Erythrocyte incubation at 49°C, resulting in spectrin denaturation, reduces the level of erythrocyte hypertonic damage at 37°C and increases it at 0°C. A decrease in the efficiency of all studied amphiphilic compounds is observed under the mentioned conditions.

**Keywords:** equine erythrocytes, hypertonic hemolysis, spectrin, amphiphilic compounds.

Потребности ветеринарной практики в криоконсервированной крови обуславливают необходимость изучения чувствительности эритроцитов разных видов животных к изменению осмотических и температурных факторов среды, которые рассматриваются как основные причины повреждения эритроцитов при замораживании [2].

Полагают, что чувствительность эритроцитов к повреждающему действию стрессовых факторов определяется состоянием их цитоскелет-мембранного комплекса [1]. Инкубация эритроцитов человека и быка при 49°C приводит к денатурации цитоскелетных белков, в частности спектрина [14], который является основным белковым компонентом эритроцитарного цитоскелета, формирующим филаментную сеть на цитоплазматической поверхности мембраны [11]. Поэтому модификация его состояния в значительной степени будет определять чувствительность клеток к действию различных стрессовых факторов.

Needs of veterinary practice in cryopreserved blood stipulate the studying of erythrocyte sensitivity of different animal species to a change in osmotic and temperature medium factors, which are considered as the main causes of erythrocyte damage under freezing [2].

Erythrocyte sensitivity to a damaging effect of stress factors is believed to be determined by the state of their cytoskeleton-membrane complex [1]. Human and bovine erythrocyte incubation at 49°C results in denaturation of cytoskeletal proteins, in particular, spectrin [14], which is the main protein component of erythrocyte cytoskeleton, forming a filament network on membrane cytoplasmic surface [11]. Therefore the modification of its state will significantly determine the cell sensitivity to the effect of various stress factors.

In contrast to many mammalian erythrocytes the equine ones are free of band 4.2 protein, being one of cytoskeletal complex components [10]. This protein is bound with band 3 protein cytoplasmic domain and interacts with ankyrin in human erythrocytes [17].

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38  
(057) 373-41-35, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:  
cryo@online.kharkov.ua

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

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 4135, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

В отличие от многих эритроцитов млекопитающих эритроциты лошади лишены одного из компонентов цитоскелетного комплекса – белка полосы 4.2 [10]. Этот белок связывается с цитоплазматическим доменом белка полосы 3 и взаимодействует с анкирином в эритроцитах человека [17].

Представители различных классов амфифильных соединений при использовании их в микромолярных концентрациях способны снижать уровень гипертонического гемолиза эритроцитов разных видов млекопитающих [3, 15]. Представляло интерес исследовать активность веществ для эритроцитов лошади, которые лишены белка полосы 4.2 и содержат спектрин в денатурированной форме (после инкубации при 49° С).

Цель работы – исследовать влияние предварительной инкубации эритроцитов лошади при 49° С на их чувствительность к гипертоническому шоку (4,0 М NaCl) и на эффективность амфифильных соединений в указанных стрессовых условиях.

### Материалы и методы

Объектами исследования были эритроциты лошади, полученные из цельной крови, заготовленной на глюцицированом консерванте. После удаления плазмы эритроциты дважды отмывали центрифугированием (при 1500 г в течение 3 мин) в 10-кратном объеме физиологического раствора (0,15 М NaCl, 0,01 М фосфатный буфер, pH 7,4). Все среды готовили на 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,4.

В работе были использованы децилсульфат натрия, додецил- $\beta$ ,D-мальтозид, трифторперазин (Calbiochem, США) и реактивы отечественного производства квалификации “х.ч.” и “ч.д.а.”.

Для гипертонического шока эритроцитов клетки переносили в раствор, содержащий 4,0 М NaCl, на 5 мин при температуре 37 или 0°С (конечный гематокрит 0,4%). Амфифильные соединения добавляли в гипертоническую среду перед внесением в нее клеток [9].

Эритроциты лошади (гематокрит 25%) инкубировали при температуре 49°С в течение 10 мин.

Количество вышедшего в супернатант гемоглобина определяли спектрофотометрически при длине волны 543 нм. За 100% принимали поглощение пробы, в которую добавляли детергент тритон X-100 в концентрации 0,1%.

Максимальную антигемолитическую активность амфифильного соединения выражали как процент снижения гемолиза клеток в присутствии вещества по отношению к гемолизу в пробе, не содержащей амфифил [6].

Экспериментальные результаты, полученные на крови 6 животных, представлены как среднее арифметическое  $\pm$  стандартная ошибка среднего,

The representatives of different classes of amphiphilic compounds when using them under micromolar concentrations are capable to reduce the level of hypertonic hemolysis in erythrocytes of different mammalian species [3, 15]. Of interest was to study the activity of substances for equine erythrocytes, free of band 4.2 protein and containing spectrin in a denatured form (after incubation at 49°С).

The research was aimed to investigate the effect of preliminary incubation of equine erythrocytes at 49°С on their sensitivity to hypertonic stress (4.0 M NaCl) and amphiphilic compound efficiency under the mentioned stress conditions.

### Materials and methods

The equine erythrocytes, procured from a whole blood, prepared with glyceric preservative, served as the investigation object. After plasma removal the erythrocyte mass was twice washed out with centrifugation (at 1500 g for 3 min) in a 10-fold volume of physiological solution (0.15 M NaCl, 0.01 M phosphate buffer, pH 7.4). All media were prepared with 0.01 M phosphate buffer, pH 7.4.

Sodium decyl sulfate, dodecyl- $\beta$ ,D-maltoside, trifluoroperazine (Calbiochem, USA) and home produced reagents with “chemically pure” and “pure for analysis” grades have been used in the research.

Cells were transferred into the 4.0 M NaCl-containing solution for 5 min at 37 or 0°С (0.4% final hematocrit) for erythrocyte hypertonic stress. Amphiphilic compounds were added into hypertonic medium prior to cell introduction [9].

Equine erythrocytes (25% hematocrit) were incubated at 49°С for 10 min.

The amount of hemoglobin, released into supernatant was spectrophotometrically determined at 543 nm wavelength. Adsorption of the sample with added 0.1% X-100 triton detergent was assumed for 100%.

The maximum antihemolytic activity of amphiphilic compound was expressed as the percentage of cell hemolysis decrease at the substance presence in respect of hemoglobin in the amphiphile-free sample [6].

The experimental results, obtained in blood of 6 animals are presented as an mean  $\pm$  standard error, M $\pm$ m. Results were processed with the Mann-Whitney and ANOVA tests. Difference between data of groups was considered as statistically significant at P < 0.05.

### Results and discussion

In order to investigate the equine erythrocyte sensitivity to hypertonic stress, cells were transferred into the 4.0 M NaCl-containing medium (Fig. 1). The level of erythrocyte hypertonic lysis at 37 and 0°С was 62 and 15%, correspondingly.

Hypertonic hemolysis of erythrocytes, preliminary subjected to incubation at 49°С significantly depends

$M \pm m$ . Анализ результатов проводили с помощью Манна-Уитни и ANOVA тестов. Разброс между группами считали статистически достоверным при  $P < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

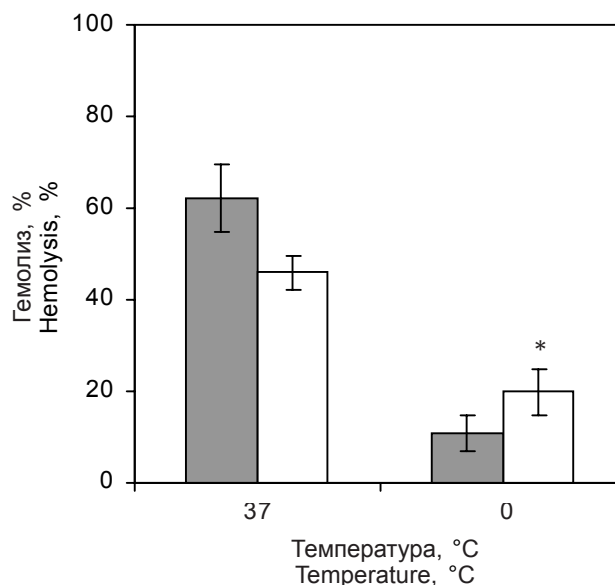
Для изучения чувствительности эритроцитов лошади к гипертоническому стрессу клетки переносили в среду, содержащую 4,0 М NaCl (рис. 1). Видно, что при температуре 37°C уровень гипертонического лизиса эритроцитов составляет 62%, а при 0°C – 15%.

Гипертонический гемолиз эритроцитов, которые предварительно подвергали инкубации при 49°C, в значительной степени зависит от температуры гипертонического раствора (рис. 1). При 37°C наблюдается снижение уровня гемолиза эритроцитов, модифицированных температурой (49°C), а при 0°C отмечается рост повреждения клеток по сравнению с контрольными значениями. Полученные результаты согласуются с данными, представленными в работе [4].

Для изучения влияния амфифильных соединений на развитие гипертонического гемолиза эритроцитов лошади были использованы представители анионных веществ децилсульфат натрия (С10), неионных – додецил- $\beta$ ,D-мальтозид (ДМ) и катионных – трифторперазин (ТФП). Для каждого соединения были сняты концентрационные зависимости гипертонического гемолиза эритроцитов лошади (4,0 М NaCl, температура 37 и 0°C). Из них определяли эффективные концентрации, соответствующие величинам максимальной антигемолитической активности ( $AG_{\max}$ ) этих соединений.

На рис. 2 представлены величины  $AG_{\max}$  амфифильных соединений в условиях гипертонического лизиса эритроцитов лошади при 37°C. Для нативных клеток используемые вещества проявляют высокую эффективность (70–85%). В результате инкубации клеток при 49°C модификация белков цитоскелета эритроцитов приводит к снижению в различной степени антигемолитической активности всех амфифильных соединений в условиях гипертонического стресса. По степени снижения эффективности вещества можно расположить в ряд: ТФП < С10 < ДМ. Таким образом, модификация цитоскелет-мембранного комплекса, обусловленная денатурацией основного цитоскелетного белка – спектрина, в меньшей степени отражается на способности заряженных амфифильных соединений защищать клетки от гипертонического повреждения при 37°C.

Снижение температуры эксперимента до 0°C (рис. 3) приводит к уменьшению величин антигемолитической активности С10 и ДМ, но эффективность положительно заряженного ТФП практически



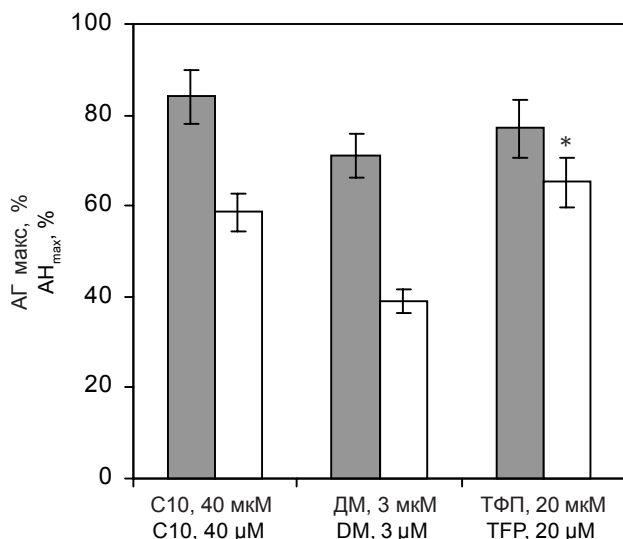
**Рис. 1.** Влияние предварительной инкубации эритроцитов лошади при 49°C на гипертонический гемолиз (4,0 М NaCl) при температуре 37 и 0°C: ■ – контроль; □ – клетки, предварительно инкубированные при 49°C; \* – различия достоверны по сравнению с контролем,  $P < 0,05$ .

**Fig. 1.** Effect of preliminary incubation of equine erythrocytes at 49°C on hypertonic hemolysis (4.0 M NaCl) at 37 and 0°C: ■ – control; □ – cells, preliminarily incubated at 49°C; \* – statistically significant differences compared to the control,  $P < 0.05$ .

on hypertonic solution temperature (Fig. 1). A decrease in hemolysis level of temperature-modified erythrocytes (49°C) is observed at 37°C but a growth in cell damage compared to the control values is noted at 0°C. The results obtained are consistent to the data, reported in the paper [4].

Such representatives of anion substances as: sodium decyl sulfate (C10), non-ion one: dodecyl- $\beta$ ,D-maltoside (DM) and cation: trifluoroperazine (TFP) were used for studying the effect of amphiphilic compounds on hypertonic hemolysis development in equine erythrocytes. For each compound we registered the concentration dependencies of equine erythrocyte hypertonic hemolysis (4.0 M NaCl, 37 and 0°C). Among them the efficient concentrations, corresponding to the maximum antihemolytic activity values ( $AH_{\max}$ ) of these compounds, were determined.

The Fig. 2 shows the  $AH_{\max}$  values of amphiphilic compounds under equine erythrocyte hypertonic lysis at 37°C. The used substances manifest a high efficiency (70–85%) for native cells. As a result of cell incubation at 49°C the modification of erythrocyte cytoskeletal proteins results in a decrease in different extent of antihemolytic activity of all amphiphilic compounds under hypertonic stress conditions. By the extent of efficiency decrease the substances may be placed in series as follows: TFP < C10 < DM. Thus, the modification of cytoskeleton-membrane complex, stipulated by a denaturation of the main cytoskeletal



**Рис. 2.** Антигемолитическая активность амфифильных веществ в условиях гипертонического гемолиза (4,0 M NaCl) эритроцитов лошади при температуре 37°C: ■ – контроль; □ – клетки, предварительно инкубированные при 49°C; \* – различия достоверны по сравнению с контролем,  $P < 0,05$ . На оси представлены эффективные концентрации используемых амфифильных соединений.

**Fig. 2.** Antihemolytic activity of amphiphilic substances under hypertonic hemolysis (4.0 NaCl) of equine erythrocytes at 37°C: ■ – control; □ – cells, preliminarily incubated at 49°C; \* – statistically significant differences compared to the control,  $P < 0.05$ . The efficient concentrations of studied amphiphilic compounds are shown in the axis.

ки не зависит от температуры при гипертоническом стрессе немодифицированных эритроцитов лошади.

Когда гипертоническому стрессу при 0°C подвергаются эритроциты, которые предварительно находились при 49°C, наблюдается снижение антигемолитической активности C10, ДМ и ТФП примерно в 2 раза. Таким образом, в условиях гипертонического шока эритроцитов при низкой температуре денатурация спектрина приводит к одинаковой степени снижения антигемолитической активности исследуемых веществ, имеющих различные физико-химические характеристики.

В основе повреждающего действия гипертонического стресса лежат процессы, обуславливающие формирование трансмембранных пор, соизмеримых по размерам с молекулами гемоглобина. Процесс образования трансмембранных дефектов при 37°C протекает гораздо легче, чем при 0°C. Похоже, что при низкой температуре в мембране, характеризующейся более плотной упаковкой своих компонентов (липидов) в латеральной плоскости, процессы зарождения дефектов и последующего их развития заторможены.

Повышение как ионной силы, так и температуры приводит к уменьшению относительных размеров белкового цитоскаркаса [16]. Следовательно, в условиях гипертонического шока при 37°C уменьшение размеров цитоскелетной сети

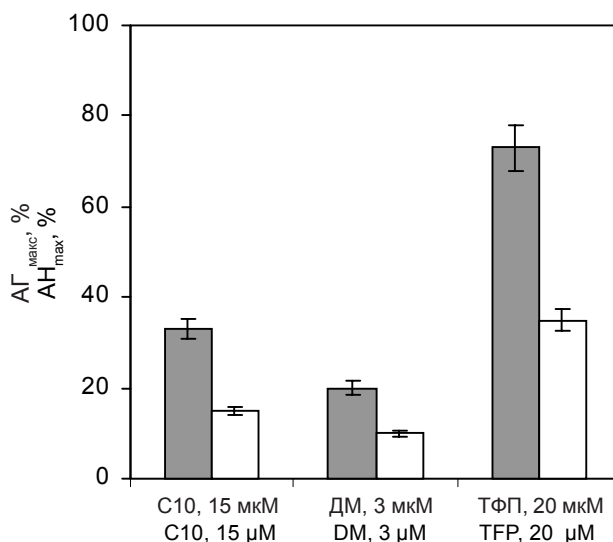
protein: spectrin, affects in a less extent the ability of charged amphiphil compounds to protect cells against hypertonic damage at 37°C.

The experimental temperature decrease down to 0°C (Fig. 3) results in a reduction of C10 and DM antihemolytic activity values but the efficiency of positively charged TFP is not practically temperature-dependent under hypertonic stress of unmodified equine erythrocytes.

When the erythrocytes, preliminary exposed at 49°C are subjected to hypertonic stress at 0°C, an approximate two-fold decrease in C10, DM and TFP antihemolytic activity is observed. Thus, spectrin denaturation results in an equal extent of antihemolytic activity decrease in studied substances with different physical and chemical characteristics under erythrocyte hypertonic stress conditions at low temperature.

The processes, stipulating the transmembrane pore formation, comparable by size with hemoglobin molecules, are in the base of hypertonic stress damaging effect. The process of transmembrane defect formation proceeds much easily at 37 than at 0°C. Under low temperature in the membrane, characterizing by a denser package of its components (lipids) in a lateral plane, the processes of defect origination and its following development look like inhibited.

An increase in both ion strength and temperature results in a decrease of protein cytoskeleton relative



**Рис. 3.** Антигемолитическая активность амфифильных веществ в условиях гипертонического гемолиза (4,0 M NaCl) эритроцитов лошади при температуре 0°C: ■ – контроль; □ – клетки, предварительно инкубированные при 49°C. На оси представлены эффективные концентрации используемых амфифильных соединений.

**Fig. 3.** Antihemolytic activity of amphiphilic substances under hypertonic hemolysis (4.0 NaCl) of equine erythrocytes at 0°C: ■ – control; □ – cells, preliminarily incubated at 49°C. The efficient concentrations of studied amphiphilic compounds are shown in the axis.

должно быть выражено в большей степени, чем при 0°C. Можно полагать, что в гипертонических условиях при 37°C белки цитоскелета, находящиеся на внутренней поверхности мембраны, оказывают более выраженный стабилизирующий эффект на образовавшиеся мембранные поры, чем при 0°C.

Инкубация эритроцитов человека при температуре выше 48°C приводит к денатурации спектрина, вследствие чего увеличивается модуль эластического сдвига мембраны и уменьшается ее текучесть [13]. Однако и после денатурации спектрин сохраняет остаточную структурную целостность [11]. Чувствительность эритроцитов, термически модифицированных, к гипертоническому стрессу в значительной степени определяется температурными условиями эксперимента (см. рис. 1). По-видимому, изменения структурно-динамических характеристик цитоскелет-мембранного комплекса эритроцитов лошади в результате высокотемпературной (49°C) инкубации по-разному проявляются в условиях их гипертонического повреждения при 37 и 0°C.

Представители разных классов амфифильных соединений оказывают защитный эффект при действии различных стрессовых факторов на эритроциты млекопитающих [7, 9, 12]. Положительно заряженные молекулы ТФП при встраивании в эритроцитарную мембрану распределяются во внутреннем монослое липидного бислоя эритроцитарной мембраны, что на макроскопическом уровне проявляется в изменении формы эритроцита по типу дискоцит-стоматоцит [5]. В основе распределения ТФП лежит электростатическое взаимодействие между положительно заряженными молекулами амфифильного соединения и отрицательно заряженным внутренним монослоем, содержащим фосфатидилсерин. С10 и ДМ, относящиеся к анионным и неионным амфифилам, соответственно встраиваются и распределяются во внешнем монослое липидного бислоя мембраны, что сопровождается трансформацией эритроцитов по типу дискоцит-эхиноцит [5].

Антигемолитический эффект амфифильных соединений связывают со способностью их молекул при встраивании в эритроцитарную мембрану разупорядочивать ее структуру и препятствовать развитию трансмембранных дефектов до размера гемолитических пор [8, 12]. Встраивание и распределение экзогенных амфифильных молекул в значительной степени определяются как состоянием эритроцитарной мембраны, так и их физико-химическими свойствами. Более жесткая структура плазматической мембраны при 0°C приводит к снижению способности амфифилов разупорядочивать мембрану, что проявляется в снижении

sizes [16]. Consequently, size decrease in cytoskeletal network should be much more expressed under hypertonic stress at 37 than at 0°C. The cytoskeletal proteins, being on inner membrane surface, are believed to cause more manifested stabilizing effect on the formed membrane pores under hypertonic conditions at 37 vs. 0°C.

Human erythrocyte incubation at temperatures higher than 48°C results in spectrin denaturation, due to that an elastic shift modulus of membrane increases and its fluidity decreases [13]. However spectrin preserves a residual structural integrity even after denaturation [11]. The sensitivity of heat-modified erythrocytes to hypertonic stress is mostly determined by experimental temperature conditions (see Fig. 1). Apparently, the changes in structural and dynamic characteristics of cytoskeletal and membrane complex of equine erythrocytes as a result of high-temperature incubation (49°C) are differently manifested under conditions of their hypertonic damage at 37 and 0°C.

The representatives of different classes of amphiphilic compounds cause a protective effect under various stress factors on mammalian erythrocytes [7, 9, 12]. The positively charged TFP molecules when building into erythrocyte membrane are spread in inner monolayer of erythrocyte membrane lipid bilayer, that is macroscopically manifested in a changed erythrocyte shape by discocyte-stomatocyte type [5]. The TFP distribution is based on electrostatic interaction between positively charged molecules of amphiphilic compound and negatively charged phosphatidyl serine-containing inner monolayer. C10 and DM, referred to anion and non-anion amphiphils, correspondingly, are built and spread into external monolayer of membrane bilayer, that is accompanied with erythrocyte transformation by discocyte-echinocyte type [5].

Antihemolytic effect of amphiphilic compounds is associated to the capability of their molecules to disorder its structure and prevent transmembrane defect development up to the hemolytic pore size when these compounds incorporate into erythrocyte membrane [8, 12]. Incorporation and distribution of exogenous amphiphilic molecules are mostly determined by both erythrocyte membrane state and their physical and chemical properties. More rigid plasmatic membrane structure at 0°C results in a decrease of amphiphile ability for membrane disordering, manifesting in lowering the efficient concentration values and the ones for antihemolytic activity of substances. Spectrin denaturation reduces the erythrocyte membrane fluidity [13]. Antihemolytic activity decrease in all studied amphiphil compounds under hypertonic stress conditions of modified erythrocytes both at 37 and 0°C testifies to the fact, that the changes in structural and dynamic state of cytoskeleton as a result of spectrin denaturation leads in erythrocyte membrane hardening.

величин эффективных концентраций и значений антигемолитической активности веществ. Денатурация спектрина уменьшает текучесть мембраны эритроцитов [13]. Снижение антигемолитической активности всех исследуемых амфифильных соединений в условиях гипертонического шока модифицированных эритроцитов как при 37, так и при 0°C свидетельствует, что изменения структурно-динамического состояния цитоскелета в результате денатурации спектрина приводит увеличению жесткости эритроцитарной мембраны.

## Выводы

1. Чувствительность эритроцитов лошади к гипертоническому стрессу при 37°C выше, чем при 0°C. Инкубация клеток при 49°C, приводящая к денатурации спектрина, снижает уровень гипертонического повреждения эритроцитов при 37 и повышает при 0°C.

2. В то время как антигемолитическая активность ТФП не зависит от температуры эксперимента, эффективность С10 и ДМ в условиях гипертонического стресса эритроцитов лошади выше при 37, чем при 0°C. Инкубация клеток при 49°C приводит к снижению максимальной антигемолитической активности амфифильных веществ как при 37, так и при 0°C.

## Литература

1. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении.– Киев: Наук. думка, 1982.– 255 с.
2. Белоус А.М., Грищенко В.И. Кробиология.– Киев: Наук. думка, 1994.– 432 с.
3. Ершов С.С., Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Чувствительность эритроцитов млекопитающих к изменению температурных и осмотических условий среды // Пробл. кробиологии.– 2004.– Т.14, № 3.– С. 51–57.
4. Ершов С.С., Шпакова Н.М. Вплив попередньої інкубації при температурі 49°C та обробки фенілгідразином на рівень гіпертонічного шоку та гіпертонічного криогемолізу еритроцитів ссавців // Збірник тез 2-го з'їзду Укр. товариства клітинної біології.– Київ, 2007.– С. 62.
5. Кулешова Л.Г., Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Антигемолитическая и трансформирующая активность амфифильных соединений // Пробл. кробиологии.– 2001.– Т. 11, №1.– С. 9–15.
6. Орлова Н.В., Шпакова Н.М. До питання про механізм захисної дії амфифільних сполук в умовах гіпертонічного гемолізу еритроцитів // Фізіолог. журнал.– 2006.– №1.– С. 55–61.
7. Писаренко Н.А., Шпакова Н.М., Орлова Н.В. Влияние амфифильных соединений на гипертонический стресс эритроцитов человека и быка // Вестник Харьков. ун-та. Серия: "Биология".– 2007.– №768.– С. 145–149.
8. Цымбал Л.В., Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Модификация хлорпромазином структурно-функционального состояния мембран эритроцитов // Биол. мембраны.– 2005.– Т. 22, № 2.– С. 105–113.
9. Шпакова Н.М., Панталер Е.Р., Бондаренко В.А. Антигемолитический эффект хлорпромазина при гипертоническом

## Conclusions

1. Equine erythrocyte sensitivity to hypertonic stress at 37°C is higher than at 0°C. Cell incubation at 49°C, resulting in spectrin denaturation, reduces the level of erythrocyte hypertonic damage at 37°C and increases it at 0°C.

Meanwhile the TFP antihemolytic activity does not depend on experimental temperature, the C10 and DM efficiency under hypertonic stress condition of equine erythrocytes is higher at 37 than at 0°C. Cell incubation at 49°C results in a decrease in the maximum antihemolytic activity of amphiphilic substances both at 37 and 0°C.

## References

1. Belous A.M., Bondarenko V.A. Structural changes in biological membranes under cooling.– Kiev: Naukova dumka, 1982.– 255 p.
2. Belous A.M., Grischenko V.I. Cryobiology.– Kiev: Naukova dumka, 1994.– 432 p.
3. Ershov S.S., Orlova N.V., Shpakova N.M. Mammalian erythrocyte sensitivity to change in temperature and osmotic medium conditions // Problems of Cryobiology.– 2004.– N3.– P. 51–57.
4. Ershov S.S., Shpakova N.M. Effect of preliminary incubation at 49°C and phenylhydrazine treatment on hypertonic stress and hypertonic cryohemolysis levels in mammalian erythrocytes // Abstract book of the 2<sup>nd</sup> Meeting of Ukrainian Society of Cell Biology.– Kiev, 2007.– P. 62.
5. Kuleshova L.G., Orlova N.V., Shpakova N.M. Antihemolytic and transforming activity of amphiphilic compounds // Problems of Cryobiology.– 2001.– N1.– P. 9–15.
6. Orlova N.V., Shpakova N.M. To the question about protective action of amphiphil compounds under erythrocyte hypertonic hemolysis // Fiziol. Zhurnal.– 2006.– N1.– P. 55–61.
7. Pisarenko N.A., Shpakova N.M., Orlova N.V. Effect of amphiphil compounds on hypertonic stress of human and bovine erythrocytes // Vestnik Kharkov. Univ. Series: Biology.– 2007.– N768.– P. 145–149.
8. Tsybaly L.V., Orlova N.V., Shpakova N.M. Modification with chlorpromazine of structural and functional state of erythrocyte membranes // Biol. Membrany.– 2005.– Vol. 22, N2.– P. 105–113.
9. Shpakova N.M., Pantaler E.R., Bondarenko V.A. Antihemolytic effect of chlorpromazine under hypertonic and cold stress of erythrocytes // Biokhimiya.– 1995.– Vol. 60, N10.– P. 1624–1631.
10. Baskurt O.K., Farley R.A., Meiselman H.J. Erythrocyte aggregation tendency and cellular properties in horse, human, and rat: a comparative study // Am. J. Physiol.– 1997.– Vol. 273, N6, Pt. 2.– P. H2604–H2612.
11. Chakrabarti A., Kelkar D.A., Chattopadhyay A. Spectrin organization and dynamics: new insights // Biosci. Rep.– 2006.– Vol. 26, N6.– P. 369–386.
12. Hagerstrand H., Isomaa B. Amphiphile-induced antihemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation // Chem. Biol. Inter.– 1991.– Vol. 79, N3.– P. 335–347.
13. Kucera W., Meier W., Lerche D. Influence of heat-induced changes in the mechanical properties of the membrane on the filterability of human erythrocytes // Biomed. Biochim. Acta.– 1986.– Vol. 45, N3.– P. 353–358.
14. Mosior M., Bobrowska M., Gomulkiewicz J. Effect of the level of ATP and of the state of spectrin on osmotic properties of bovine erythrocyte // Biochim. Biophys. Acta.– 1990.– Vol. 1022, N3.– P. 355–360.

- и холодовом шоке эритроцитов // Биохимия.– 1995.– Т. 60, № 10.– С. 1624–1631.
10. *Baskurt O.K., Farley R.A., Meiselman H.J.* Erythrocyte aggregation tendency and cellular properties in horse, human, and rat: a comparative study // *Am. J. Physiol.*– 1997.– Vol. 273, N6, Pt. 2.– P. H2604–H2612.
  11. *Chakrabarti A., Kelkar D.A., Chattopadhyay A.* Spectrin organization and dynamics: new insights // *Biosci. Rep.*– 2006.– Vol. 26, N6.– P. 369–386.
  12. *Hagerstrand H., Isomaa B.* Amphiphile-induced antihemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation // *Chem. Biol. Inter.*– 1991.– Vol. 79, N3.– P. 335–347.
  13. *Kucera W., Meier W., Lerche D.* Influence of heat-induced changes in the mechanical properties of the membrane on the filterability of human erythrocytes // *Biomed. Biochim. Acta.*– 1986.– Vol. 45, N3.– P. 353–358.
  14. *Mosior M., Bobrowska M., Gomulkiewicz J.* Effect of the level of ATP and of the state of spectrin on osmotic properties of bovine erythrocyte // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1990.– Vol. 1022, N3.– P. 355–360.
  15. *Synchykova O.P., Shpakova N.M., Bondarenko V.A.* Effect of alkyl- $\beta$ , D-glucopyranosides on hypertonic haemolysis of erythrocytes // *Bioelectrochemistry.*– 2004.– Vol.62.– P. 163–167.
  16. *Vertessy B.G., Steck T.L.* Elasticity of the human red cell membrane skeleton. Effects of temperature and denaturants // *Biophys. J.*– 1989.– Vol. 55, N2.– P. 255–262.
  17. *Yawata Y.* Cell Membrane: The red blood cell as a model.– Weinheim: WILEY-VCH Verlag, 2003.– 439 p.

*Accepted in 04.12.2007*

*Поступила 04.12.2007  
Рецензент Н.Г. Землянских*