

УДК 612.111.014.462.085.2:577.335:541.183

Н.А. Ершова, Е.Е. Нипот, Н.М. Шпакова\*, С.С. Ершов, Н.В. Орлова

## Влияние трифторперазина и додецил- $\beta$ ,D-мальтозида на гипертонический стресс эритроцитов млекопитающих

UDC 612.111.014.462.085.2:577.335:541.183

### N.A. Yershova, E.E. Nipot, N.M. Shpakova\*, S.S. Yershov, N.V. Orlova Effect of Trifluoperazine and Dodecyl- $\beta$ ,D-maltoside on Hypertonic Stress of Mammalian Erythrocytes

**Реферат:** В работе исследовано влияние додецил- $\beta$ ,D-мальтозида (ДМ) и трифторперазина (ТФП) на чувствительность эритроцитов млекопитающих (человек, бык, лошадь, кролик) к гипертоническому стрессу (ГС) (4,0 моль/л NaCl). Показано, что использование амфифильных соединений в определенных концентрациях приводит к повышению устойчивости к ГС эритроцитов человека, быка, лошади, но не кролика. Защитное действие амфифильных соединений выше при температуре 37°C, чем при 0°C. Катионный ТФП более эффективен, чем неионный ДМ. Установлено, что исследуемые вещества не влияют на выход катионов калия из клеток в условиях ГС. Предполагается, что защитный эффект ТФП и ДМ связан с их пертурбирующим действием на мембрану и предотвращением развития трансмембранных дефектов до размера гемолитических пор.

**Ключевые слова:** эритроциты млекопитающих, гипертонический стресс, амфифильные соединения, катионы калия.

**Реферат:** У роботі досліджено вплив додецил- $\beta$ ,D-мальтозиду (ДМ) і трифторперазину (ТФП) на чутливість еритроцитів ссавців (людина, бик, кінь, кролик) до гіпертонічного стресу (ГС) (4,0 моль/л NaCl). Показано, що використання амфифільних сполук у певних концентраціях призводить до підвищення стійкості до ГС еритроцитів людини, бика, коня, але не кролика. Захисна дія амфифільних сполук вища за температури 37°C, ніж за 0°C. Катионний ТФП ефективніший, ніж неіонний ДМ. Встановлено, що досліджувані речовини не впливають на вихід катіонів калію з клітин в умовах ГС. Припускається, що захисний ефект ТФП і ДМ пов'язаний із їхньою пертурбуючою дією на мембрану та запобіганням розвитку трансмембранних дефектів до розміру гемолітичних пор.

**Ключові слова:** еритроцити ссавців, гіпертонічний стрес, амфифільні сполуки, катіони калію.

**Abstract:** The effect of dodecyl- $\beta$ ,D-maltoside (DM) and trifluoperazine (TFP) on mammalian (human, bovine, equine, rabbit) erythrocyte sensitivity to hypertonic stress (HS) (4.0 mol/l NaCl) was studied in this work. The use of amphiphilic compounds in the certain concentrations was demonstrated as resulting in an increased resistance to HS of human, bovine, equine erythrocytes, but not rabbit ones. Protective effect of amphiphilic compounds is higher at 37°C than at 0°C. Cationic TFP is more efficient than non-ionic DM. The substances under study were established as not affecting the potassium cation release out of cells under HS. Protective mechanism of TFP and DM is suggested as associated with their perturbing action on a membrane and prevention of transmembrane defect development up to hemolytic pore size.

**Key words:** mammalian erythrocytes, hypertonic stress, amphiphilic compounds, potassium cations.

Гипертонический стресс (ГС) эритроцитов – повреждение клеток при помещении их в гипертонические растворы. В криобиологии ГС используется в качестве модельного эксперимента, позволяющего изучать действие одного из основных факторов криповреждения клеток – гипертонического раствора, образующегося в процессе вымораживания воды [16].

Известно, что анионные амфифильные соединения в микромолярных концентрациях снижают уровень ГС эритроцитов млекопитающих [5, 10]. Защитное действие данных соединений связывают с их способностью встраиваться в мембрану и модифицировать ее путем изменения состояния

Hypertonic stress (HS) of erythrocytes is the injury of cells when placing them into hypertonic solutions. HS is used in cryobiology as a model experiment enabling to study the effect of one of the main factors of cell damage: hypertonic solution, which forms during water freeze-out [5].

Anionic amphiphilic compounds in micromolar concentrations are known to reduce the HS level in mammalian erythrocytes [21, 17]. A protective effect of these compounds is associated with their capability to be incorporated into a membrane and modify it via changing lipid bilayer state [8, 13, 15]. In order to find out whether amphiphilic compounds, referred to other classes, have an antihemolytic effect and what is the

Отдел криофизиологии клетки, 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: starling\_nataly@mail.ru

Поступила 25.02.2014  
Принята в печать 26.03.2014

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 24, №3. – С. 231–237.  
© 2014 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Department of Cell Cryophysiology, 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: starling\_nataly@mail.ru

Received February, 25, 2014  
Accepted March, 26, 2014

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2014. 24(3): 231–237.  
© 2014 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

липидного бислоя [6, 9, 13]. Чтобы выяснить, обладают ли антигемолитическим действием амфифильные соединения, относящиеся к другим классам, и с чем связан их защитный эффект в условиях ГС эритроцитов, использовали катионный трифторперазин и неионный додецил- $\beta$ ,D-мальтозид.

В качестве объекта исследования выбраны эритроциты человека, лошади, быка и кролика. Известно [12, 20], что эритроциты этих видов млекопитающих значительно отличаются по фосфолипидному составу мембран, что позволит оценить вклад состава мембран эритроцитов в проявление защитного действия амфифильных соединений.

Цель работы – исследование влияния додецил- $\beta$ ,D-мальтозида и трифторперазина на чувствительность эритроцитов млекопитающих (человек, бык, лошадь, кролик) к гипертоническому стрессу (4,0 моль/л NaCl).

### Материалы и методы

Для исследования использовали эритроциты, полученные из крови человека (*Homo sapiens*), быка (*Bos taurus*), лошади (*Equus caballus*) и кролика (*Oryctolagus cuniculus*), заготовленной на консерванте «Глюгидир» (Украина). Выделение эритроцитов проводили по стандартной методике [8]. Кровь мужчин (группа II) была предоставлена Харьковским областным центром службы крови, кровь самцов кролика – виварием ИПКиК НАНУ, лошади и быка – Харьковской государственной зооветеринарной академией. Заготовку крови животных и все манипуляции проводили в соответствии с отечественными и международными биотехническими нормами.

Гипертонический стресс эритроцитов осуществляли путем инкубации эритроцитов в растворе, содержащем 4,0 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатного буфера (pH 7,4) при температуре 37 или 0°C в течение 5 мин. Конечный гематокрит – 0,4%. Трифторперазин (ТФП) и додецил- $\beta$ ,D-мальтозид (ДМ) добавляли в гипертоническую среду перед внесением в нее клеток. Содержание вышедшего в супернатант гемоглобина определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 543 нм. За 100% принимали поглощение пробы, в которую добавляли тритон X-100 (0,1%).

Содержание ионов  $K^+$  определяли в супернатанте после инкубации эритроцитов млекопитающих с амфифильными веществами в среде, содержащей 0,15 моль/л NaCl или 4,0 моль/л NaCl, в течение 10 мин с помощью ионоселективного электрода ЭЛИС-121К. Конечный гематокрит – 20%.

В работе использовали додецил- $\beta$ ,D-мальтозид («Calbiochem», США) и трифторперазин («Sigma»,

rea-son of their protective effect under erythrocyte HS, we used a cationic trifluoperazine and non-ionic dodecyl- $\beta$ ,D-maltoside.

Human, equine, bovine and rabbit erythrocytes were selected as the research object. Erythrocytes of these mammalian species are known [4, 19] to differ significantly by phospholipid composition of membranes, that will allow to assess the contribution of erythrocyte membrane composition into manifestation of amphiphilic compound protective effect.

The research was aimed to study the effect of dodecyl- $\beta$ ,D-maltoside and trifluoperazine on the sensitivity of mammalian (human, bovine, equine, rabbit) erythrocytes to hypertonic stress (4.0 mol/l NaCl).

### Materials and methods

For the research we used the erythrocytes procured from human (*Homo sapiens*), bovine (*Bos taurus*), equine (*Equus caballus*) and rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) blood preserved with Glugicir (Ukraine) preservative. Erythrocytes were isolated according to the standard technique [16]. Male blood (group II) was provided by the Kharkov Regional Center of Blood Banking, male rabbit blood was done by the vivarium of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, equine and bovine blood was obtained at Kharkov State Zooveterinary Academy. Animal blood procurement and all the manipulations were performed according to the national and international bioethical standards.

Hypertonic stress of erythrocytes was initiated by their incubation in the solution containing 4.0 mol/l NaCl, 0.01 mol/l phosphate buffer, pH 7.4 at 37 or 0°C within 5 min. Final hematocrit was 0.4%. Hypertonic medium was supplemented with trifluoperazine (TFP) and dodecyl- $\beta$ ,D-maltoside (DM) prior to cell introducing into it. The content of hemoglobin released in supernatant was spectrophotometrically determined at 543 nm wavelength. The sample absorption, supplemented with triton X-100 (0.1%) was accepted as 100%.

The  $K^+$  ion content was determined in a supernatant after mammalian erythrocyte incubation with amphiphilic substances in the medium, containing either 0.15 mol/l NaCl or 4.0 mol/l NaCl for 10 min by means of ion-selective electrode ELIS-121K. Final hematocrit was 20%.

We used DM (Clabiochem, USA) and TFP (Sigma, USA), as well as the home produced reagents of chemically pure and pure for analysis grades.

The results were statistically processed with ANOVA test and Mann-Whitney criterion (Statgraph Win). Divergence between the groups was considered as significant at  $p < 0.05$ .



США), а также реактивы отечественного производства квалификации «х. ч.» и «ч. д. а.».

Статистическую обработку результатов проводили с помощью теста ANOVA и критерия Манна-Уитни («StatgraphWin»). Расхождения между группами считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Для изучения влияния ДМ и ТФП на чувствительность эритроцитов млекопитающих к ГС были оценены уровни гипертонического гемолиза клеток в средах, содержащих различные концентрации амфифильных соединений при температуре 37 и 0°C. Данные, полученные для эритроцитов человека, представлены на рисунке. Следует отметить, что на всех графиках представлено максимальное среднеквадратичное отклонение величины гемолиза эритроцитов в виде точки с разбросом значений, имеющих соответствующую маркировку. Видно, что при увеличении концентрации обоих амфифильных веществ происходит постепенное снижение уровня лизиса клеток с последующим его повышением до исходного значения и выше.

Таким образом, использование амфифильных соединений в определенных концентрациях приводит к повышению устойчивости эритроцитов человека к ГС как при температуре 37°C, так и при 0°C. Однако защитное действие амфифильных соединений более выражено при 37°C. Понижение температуры до 0°C приводит к уменьшению эффективности исследуемых соединений и сдвигу минимума гемолитической зависимости в сторону меньших значений концентраций амфифилов.

Аналогичные гемолитические зависимости были получены для эритроцитов быка, лошади и кролика. Как видно из рисунка С–F, ТФП и ДМ оказывают защитное действие в условиях ГС эритроцитов быка и лошади при 37°C. При температуре 0°C незначительный защитный эффект был выявлен только с использованием ТФП для эритроцитов лошади. Амфифильные соединения были неэффективны для эритроцитов кролика в условиях ГС при 37 и 0°C (рисунок G, H).

Гипертоническое повреждение эритроцитов связывают с формированием трансмембранных дефектов в условиях высокой тоничности внеклеточной среды и дальнейшим их ростом, вплоть до образования гемолитических пор [2, 3]. Встраивание экзогенных амфифильных молекул в плазматическую мембрану эритроцитов сопровождается изменением ее организации. Такая реорганизация может быть обусловлена асимметричным встраиванием амфифильных молекул в наружный или

### Results and discussion

To study the DM and TFP effects on mammalian erythrocyte sensitivity to HS we assessed the levels of cell hypertonic hemolysis in the media, containing different concentrations of amphiphilic compounds at 37 and 0°C. The data, obtained for human erythrocytes are presented in Figure. It is to be noted that all the plots show the maximum root-mean-square deviation of erythrocyte hemolysis value as a point with data scattering having an appropriate labeling. It is seen that with increasing concentration of both amphiphilic substances there is occurred a gradual decrease in cell lysis level with its following augmentation up to initial value and higher.

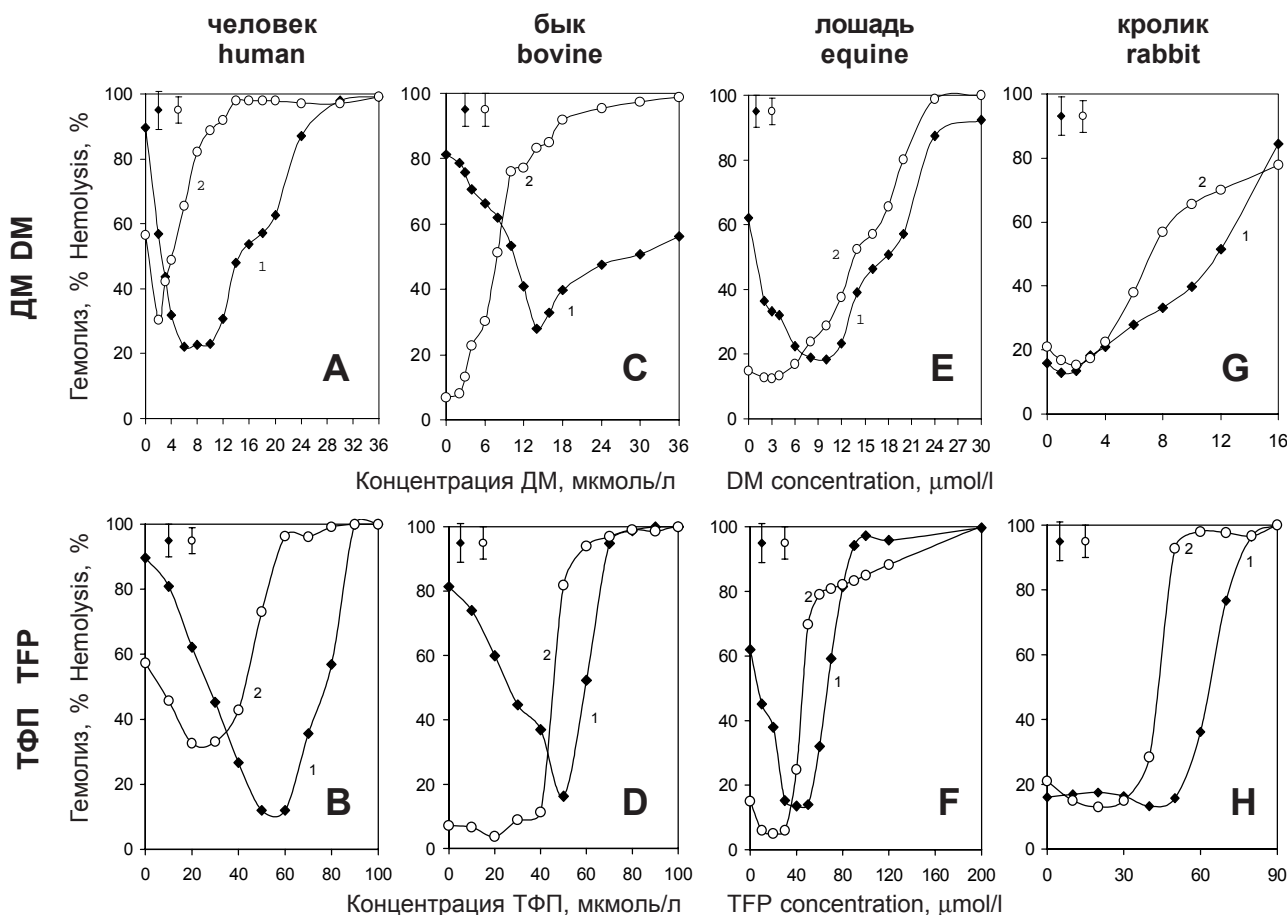
Thus, the use of amphiphilic compounds in certain concentrations leads to an increased resistance of human erythrocytes to HS both at 37 and 0°C. However a protective effect of amphiphilic compounds is more pronounced at 37°C. Temperature decrease down to 0°C results in a reduction of the efficiency in studied compounds and a shift in the minimum of hemolytic dependency towards lower values of amphiphilic concentrations.

Similar hemolytic dependencies were obtained for bovine, equine and rabbit erythrocytes. As Figures C–F show, the TFP and DM have a protective effect under HS conditions in bovine and equine erythrocytes at 37°C. A slight protective effect was found only using TFP for equine erythrocytes at 0°C. Amphiphilic compounds were inefficient for rabbit erythrocytes under HS at 37 and 0°C (Fig. G, H).

Hypertonic damage of erythrocytes is associated with the formation of transmembrane defects under a high tonicity of extracellular medium and their further growth up to hemolytic pore formation [3, 6]. Building of exogenous amphiphilic molecules into erythrocyte plasma membrane is accompanied by a change in its organization. This rearrangement may be due to asymmetric incorporation of amphiphilic molecules into external or internal membrane monolayer, rearrangement in lipids both inside one monolayer and between two membrane monolayers, the formation of temporary non-bilayer phases [1, 8, 18]. We may assume that amphiphiles are capable to prevent the transmembrane pore formation under hypertonic stress via reducing phospholipid ordering in bilayer.

The incorporation and distribution of amphiphilic molecules are significantly determined by the state of erythrocyte membrane. Amphiphilic compounds are known to be preferably included into liquid crystal membrane areas [9, 14]. When decreasing temperature down to 0°C some lipids pass from a liquid crystal phase into gel one, whereby the membrane area, occupied by liquid crystal domains is reduced. Consequently,





Влияние ДМ (A, C, E, G) и ТФП (B, D, F, H) на гипертонический гемолиз эритроцитов человека (A, B), быка (C, D), лошади (E, F) и кролика (G, H) в среде, содержащей 4,0 моль/л NaCl, при температуре 37 (1) и 0°C (2).  
 Effect of DM (A, C, E, G) and TFP (B, D, F, H) on hypertonic hemolysis of human (A, B), bovine (C, D), equine (E, F) and rabbit (G, H) erythrocytes in the medium contained 4.0 mol/l NaCl at 37 (1) and 0°C (2).

внутренний монослой мембраны, перераспределением липидов как внутри одного монослоя, так и между двумя монослоями, образованием временных небислоиных фаз [7, 11, 13]. Можно предположить, что амфифилы посредством уменьшения упорядоченности фосфолипидов в бислое способны препятствовать образованию трансмембранных пор в условиях гипертонического стресса.

Встраивание и распределение амфифильных молекул в значительной степени определяются состоянием эритроцитарной мембраны. Известно, что амфифильные соединения предпочтительно включаются в жидкокристаллические области мембраны [14, 19]. При понижении температуры до 0°C часть липидов переходит из жидкокристаллической в гелевую фазу, в результате чего площадь мембраны, занимаемая жидкокристаллическими доменами, уменьшается. Следовательно, при температуре 0°C снижается как уровень включения амфифильных соединений в мембрану клетки, так и степень ее пертурбации. Это, в свою очередь,

at 0°C there is a decrease in both level of amphiphilic compound incorporation into cell membrane, and the degree of its perturbation as well. In its turn it may be the cause of reduced efficient concentrations of TFP and DM under HS at 0°C (Figure).

The place of amphiphilic substance incorporation is a lipid bilayer, so we can assume the intensity in protective action of amphiphilic compounds for mammalian erythrocytes to be determined by differences in phospholipid composition of their membranes. In particular, the absence of TFP and DM protective effect for rabbit erythrocytes (Fig. G, H) may be associated with a high cholesterol content in their membranes [12], making it difficult to reorganize the membrane during amphiphiles incorporation into it. When analyzing the characteristics of lipid composition of erythrocyte membranes of mammals, namely the ratio between phospholipids increasing the membrane rigidity (sphingomyelin, phosphatidylethanolamine) and phospholipid, reducing it (phosphatidylcholine), as well as taking cholesterol content into account, we may assume the





может быть причиной снижения эффективных концентраций ТФП и ДМ в условиях ГС при 0°C (рисунок).

Местом встраивания амфифильных веществ является липидный бислой, поэтому можно предположить, что степень проявления защитного действия амфифильных соединений для эритроцитов млекопитающих определяется различиями в фосфолипидном составе их мембран. В частности, отсутствие защитного действия ДМ и ТФП для эритроцитов кролика (рисунок G, H) может быть связано с высоким содержанием холестерина в их мембранах [18], что затрудняет реорганизацию мембраны при встраивании в нее амфифилов. Анализируя особенности липидного состава эритроцитарных мембран млекопитающих, а именно соотношение между фосфолипидами, увеличивающими жесткость мембраны (сфингомиелин, фосфатидилэтанолламин) и фосфолипидом, снижающим ее жесткость (фосфатидилхолин), а также учитывая содержание холестерина, можно предположить, что мембраны эритроцитов человека и лошади обладают наибольшей текучестью [18, 20, 21]. В связи с этим встраивание амфифильных молекул в мембраны эритроцитов этих млекопитающих облегчается, и даже при температуре 0°C в условиях «уплотненной мембраны» наблюдается защитный эффект (рисунок A, B, F).

Как следует из полученных результатов, степень защиты клеток при ГС эритроцитов зависит от вида используемого амфифильного вещества. Так, ТФП является более эффективным, чем ДМ. Известно, что неионный ДМ встраивается в наружный слой липидного бислоя мембраны, а катионный ТФП, пересекая наружный монослой, распределяется преимущественно во внутреннем [15, 17]. Возможно, этот факт определяет большую пертурбирующую способность ТФП и, как следствие, его большую эффективность в условиях гипертонического шока.

Полагают, что в условиях ГС происходит утечка ионов калия из клеток в результате образования мембранных микродефектов, которые формируются или активируются под влиянием повышенной осмолярности среды [1, 4].

Для установления возможной связи защитного эффекта амфифильных соединений с состоянием барьерных свойств мембран эритроцитов (по отношению к ионам калия) в условиях ГС исследовали выход  $K^+$  из эритроцитов млекопитающих в присутствии ТФП и ДМ в концентрациях, при которых наблюдался максимальный защитный эффект.

В табл. 1 представлены данные о содержании  $K^+$  в супернатанте после инкубации эритроцитов млекопитающих с амфифильными веществами.

membranes of human and equine erythrocytes to have the highest fluidity [12, 19, 20]. Therefore the incorporation of amphiphilic molecules into erythrocyte membranes of these mammals is facilitated, and even at 0°C under ‘densified membrane’ conditions a protective effect is observed (Fig. A, B, F).

As proceeding from the results obtained the protection degree of cells under erythrocyte HS depends on a kind of amphiphilic substance. Thus, TFP is more efficient than DM. Nonionic DM is known to be built into external layer of membrane lipid bilayer, but cationic TFP by crossing the external monolayer is distributed mainly in the internal one [10, 11]. This fact possibly determines the higher TFP ability to perturbation, and consequently its greater efficiency under hypertonic stress.

Leak of potassium ions out of cells under HS is believed [2, 7] to occur due to appearance of membrane microdefects, being formed or activated under the influence of increased osmolarity of the medium.

To establish a possible relationship of protective effect of amphiphilic compounds with the state of barrier properties of erythrocyte membranes (towards potassium ions) under HS we studied the  $K^+$  release out of mammalian erythrocytes in the presence of TFP and DM under concentrations when the maximum protective effect was observed.

The Table 1 summarizes the data on  $K^+$  content in supernatant after incubating mammalian erythrocytes

**Таблица 1.** Выход ионов  $K^+$  из эритроцитов млекопитающих в среде, содержащей 0,15 моль/л NaCl, при температуре 37 и 0°C в присутствии амфифильных веществ

**Table 1.** Potassium ion outflux of mammalian erythrocytes in the medium contained 0.15 mol/l NaCl at 37 and 0°C in the presence of amphiphilic substances.

Источник клеток Cell source	Температура, °C Temperature, °C	Выход ионов калия, % Potassium ion outflux, %		
		Контроль Control	ДМ DM	ТФП TFP
Человек Human	37	3 ± 2	3 ± 2	4 ± 2
	0	3 ± 3	3 ± 2	2 ± 1
Лошадь Equine	37	3 ± 2	3 ± 2	3 ± 2
	0	5 ± 3	6 ± 3	5 ± 3
Бык Bovine	37	3 ± 1	3 ± 1	3 ± 1
	0	2 ± 1	2 ± 2	2 ± 1
Кролик Rabbit	37	5 ± 2	4 ± 2	6 ± 2
	0	3 ± 1	3 ± 1	3 ± 1



Видно, что ТФП и ДМ не влияют на выход  $K^+$  из эритроцитов млекопитающих, находящихся в физиологических условиях. Оценка барьерных свойств мембран эритроцитов млекопитающих в присутствии ТФП и ДМ в среде, содержащей 4,0 моль/л NaCl (табл. 2), показала, что выход  $K^+$  из эритроцитов статистически значимо не изменяется. Возможно, амфифильные соединения не оказывают влияние на формирование микродефектов, проницаемых для  $K^+$ , а предотвращают их развитие до размера гемолитических пор.

### Выводы

В условиях ГС эритроцитов защитный эффект амфифильных соединений зависит от видовой принадлежности клеток, температурных условий среды и вида амфифильного соединения. Так, защитное действие ДМ и ТФП выявлено для эритроцитов человека, быка, лошади, но не кролика. При 37°C антигемолитическое действие веществ выше, чем при 0°C. Трифторперазин более эффективен, чем ДМ. Показано, что в условиях ГС исследуемые амфифильные вещества не влияют на выход катионов калия из эритроцитов млекопитающих.

### Литература

1. Белоус А.М., Гордиенко Е.А., Розанов Л.Ф. Замораживание и криопротекция. – М.: Высш. шк., 1987. – 81 с.
2. Белоус А.М., Грищенко В.И. Кробиология. – К.: Наук. думка, 1994. – 432 с.
3. Гордиенко Е.А., Пушкар Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – К.: Наук. думка, 1994. – 141 с.
4. Гулевский А.К., Бондаренко В.А., Белоус А.М. Барьерные свойства биомембран при низких температурах. – К.: Наук. думка, 1988. – 206 с.
5. Ершова Н.А., Шпакова Н.М., Орлова Н.В. Влияние фенилгидразина и алкилсульфатов на осмотическую чувствительность эритроцитов млекопитающих // Доповіді Національної академії наук України. – 2012. – №6. – С. 129–133.
6. Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Механізм захисної дії амфифільних сполук в умовах гіпертонічного гемолізу еритроцитів // Фізіологічний журнал. – 2006. – Т. 52, №5. – С. 55–61.
7. Цымбал Л.В., Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Модификация хлорпромазином структурно-функционального состояния мембран эритроцитов // Биологические мембраны. – 2005. – Т. 22, №4. – С. 327–335.
8. Шпакова Н.М., Дунаевская О.Н., Сынчикова О.П. Действие трифторперазина на гемоліз эритроцитов в гипертонических растворах электролитов // Проблемы кробиологии. – 2002. – №3. – С. 7–15.
9. Шпакова Н.М. Возможный механизм коррекции осмотической и температурной чувствительности эритроцитов человека с помощью алкил- $\beta$ ,D-глюкопиранозидов // Проблемы кробиологии. – 2009. – Т. 19, №4. – С. 449–460.
10. Шпакова Н.М., Писаренко Н.А., Нипот Е.Е. Влияние алкилсульфатов на гипертонический гемоліз эритроцитов млекопитающих // Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини. – 2010. – Вип. 21, Ч. 2, Т. 2. – С. 89–96.

**Таблица 2.** Выход ионов  $K^+$  из эритроцитов млекопитающих в среде, содержащей 4 моль/л NaCl, при температуре 37 и 0°C в присутствии амфифильных веществ

**Table 2.** Potassium ion outflux of mammalian erythrocytes in the medium contained 4 mol/l NaCl at 37 and 0°C in the presence of amphiphilic substances.

Источник клеток Cell source	Температура, °C Temperature, °C	Выход ионов калия, % Potassium ion outflux, %		
		Контроль Control	ДМ DM	ТФП TFP
Человек Human	37	91 ± 5	92 ± 5	89 ± 4
	0	92 ± 4	91 ± 4	89 ± 7
Лошадь Equine	37	93 ± 4	93 ± 3	93 ± 4
	0	93 ± 4	-	92 ± 4
Бык Bovine	37	94 ± 3	92 ± 5	94 ± 3
	0	-	-	-
Кролик Rabbit	37	-	-	-
	0	-	-	-

with amphiphilic substances. It is seen that TFP and DM do not affect the  $K^+$  release out of mammalian erythrocytes, being under physiological conditions. Evaluation of barrier properties of mammalian erythrocyte membranes in TFP and DM presence in 4.0 mol/l NaCl-containing medium (Table 2) showed the  $K^+$  release out of erythrocytes as remained significantly unchanged. Possibly, amphiphilic compounds do not affect the formation of microdefects, being permeable for  $K^+$  and prevent their development up to a hemolytic pore size.

### Conclusions

Under HS of erythrocytes a protective effect of amphiphilic compounds depends on cell species specificity, temperature conditions of medium and applied amphiphilic compound. Thus, a protective effect of DM and TFP was revealed for human, bovine, equine erythrocytes, but not for rabbit ones. At 37°C antihemolytic action of substances is higher than that at 0°C. In this case the TFP is more efficient than DM. Under HS the studied amphiphilic substances were demonstrated as not affecting the release of potassium cations out of mammalian erythrocytes.

### References

1. Balgavy P., Devinsky F. Cut-off effects in biological activities of surfactants. Adv Colloid Interface Sci 1996; 66: 23–63.



11. Balgavy P., Devinsky F. Cut-off effects in biological activities of surfactants // *Adv. Colloid. Interface Sci.* – 1996. – Vol. 66. – P. 23–63.
12. Ferlazzo A.M., Bruschetta G., Di Pietro P. et al. Phospholipid composition of plasma and erythrocyte membranes in animal species by  $^{31}\text{P}$  NMR // *Vet. Res. Commun.* – 2011. – Vol. 35. – P. 521–530.
13. Hagerstrand H., Isomaa B. Amphiphile-induced antihaemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation // *Chemico-Biological Interactions.* – 1991. – Vol. 79. – P. 335–347.
14. Hanpft R., Mohr K. Influence of cationic amphiphilic drugs on the phase-transition temperature of phospholipids with different polar headgroups // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1985. – Vol. 814, №1. – P. 156–162.
15. Kanaho Y., Sato T., Fujii T. The affinity of various phenothiazine drugs for membranes of intact erythrocytes and their membrane-transforming activity // *Mol. Pharmacol.* – 1981. – №20. – P. 704–708.
16. *Life in the frozen state* / edited by B.J. Fuller, N. Lane, E.E. Benson. – Boca Raton: CRC Press, 2004. – 672 p.
17. Malheiros S.V., Brito M.A., Brites D., Meirelles N.C. Membrane effects of trifluoperazine, dibucaine and praziquantel on human erythrocytes // *Chemico-Biological Interactions.* – 2000. – Vol. 126. – P. 79–95.
18. Nelson G.J. Composition of neutral lipids from erythrocytes of common mammals // *J. Lipid Research.* – 1967. – Vol. 8, №4. – P. 374–379.
19. Schreier S., Malheiros S.V., Paula E.D. Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactant. Physicochemical and biological aspect // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – Vol. 1508, №1–2. – P. 210–234.
20. Wessels J.M., Veerkamp J.H. Some aspects of the osmotic lysis of erythrocytes III. Comparison of glycerol permeability and lipid composition of red blood cell membranes from eight mammalian species // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1973. – Vol. 291, №1. – P. 190–196.
21. Yawata Y. *Cell membrane: the red blood cell as a model.* – Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2003. – 448 p.
2. Belous A.M., Gordienko E.A., Rozanov L.F. Freezing and cryoprotection. Moscow: Vyscha Shkola; 1987.
3. Belous A.M., Grischenko V.I. *Cryobiology.* Kiev: Nauk Dumka; 1994.
4. Ferlazzo A.M., Bruschetta G., Di Pietro P. et al. Phospholipid composition of plasma and erythrocyte membranes in animal species by  $^{31}\text{P}$  NMR. *Vet Res Commun* 2011; 35: 521–530.
5. Fuller B.J., Lane N., Benson E.E., editors. *Life in the frozen state.* Boca Raton: CRC Press; 2004.
6. Gordienko E.A., Pushkar N.S. Physical grounds of low temperature preservation of cell suspensions. Kiev: Nauk Dumka; 1994.
7. Gulevsky A.K., Bondarenko V.A., Belous A.M. Barrier properties of biomembranes at low temperatures. Kiev: Nauk Dumka; 1988.
8. Hagerstrand H., Isomaa B. Amphiphile-induced antihaemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation. *Chem Biol Inter* 1991; 79: 335–347.
9. Hanpft R., Mohr K. Influence of cationic amphiphilic drugs on the phase-transition temperature of phospholipids with different polar headgroups. *Biochim Biophys Acta* 1985; 814(1): 156–162.
10. Kanaho Y., Sato T., Fujii T. The affinity of various phenothiazine drugs for membranes of intact erythrocytes and their membrane-transforming activity. *Mol Pharmacol* 1981; 20: 704–708.
11. Malheiros S.V., Brito M.A., Brites D., Meirelles N.C. Membrane effects of trifluoperazine, dibucaine and praziquantel on human erythrocytes. *Chem Biol Inter* 2000; 126: 79–95.
12. Nelson G.J. Composition of neutral lipids from erythrocytes of common mammals. *J Lipid Research* 1967; 8(4): 374–379.
13. Orlova N.V., Shpakova N.M. Mechanism of protective effect of amphiphilic compounds under hypertonic hemolysis of erythrocytes. *Fiziol Zhurnal* 2006; 52(5): 55–61.
14. Schreier S., Malheiros S.V., Paula E.D. Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactant. Physicochemical and biological aspect. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1508(1–2): 210–234.
15. Shpakova N.M. Possible mechanism of correction of osmotic and temperature sensitivity of human erythrocytes using alkyl- $\beta$ ,D-glucopyranosides. *Problems of Cryobiology* 2009; 19(4): 449–460.
16. Shpakova N.M., Dunayevskaya O.N., Synchikova O.P. Effect of trifluoperazine on erythrocyte hemolysis in hypertonic solutions of electrolytes. *Problems of Cryobiology* 2002; 3: 7–15.
17. Shpakova N.M., Pisarenko N.A., Nipot E.E. Effect of alkyl sulfates on hypertonic hemolysis of mammalian erythrocytes. *Problemy Zoonzhenerii ta Veterinarnoi Meditsyny* 2010; 2 (21 Pt 2): 89–96.
18. Tsymbal L.V., Orlova N.V., Shpakova N.M. Modification with chlorpromazine of structural and functional state of erythrocyte membranes. *Biol Membrany* 2005; 22(4): 327–335.
19. Wessels J.M., Veerkamp J.H. Some aspects of the osmotic lysis of erythrocytes III. Comparison of glycerol permeability and lipid composition of red blood cell membranes from eight mammalian species. *Biochim Biophys Acta* 1973; 291(1): 190–196.
20. Yawata Y. *Cell membrane: the red blood cell as a model.* Weinheim: Wiley-VCH Verlag; 2003.
21. Yershova N.A., Shpakova N.M., Orlova N.V. Effect of phenylhydrazine and alkyl sulfates on osmotic sensitivity of mammalian erythrocytes. *Reports of Nat Acad Sci of Ukraine* 2012; 6: 129–133.