

ЧУТЛИВІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ ДО СТРЕСОВОГО ВПЛИВУ

Л. Коба¹, О. Ніпот², О. Шапкіна², А. Жуйкова¹, В. Бондаренко¹

*¹Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна
пл. Свободи, 4, Харків 61022, Україна*

*²Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України
вул. Переяславська, 23, Харків 61016, Україна
e-mail: nipotel71@gmail.com*

У роботі досліджено вікові особливості чутливості еритроцитів 1- і 12-місячних щурів до гіпертонічних умов середовища після їхньої модифікації геміном.

Встановлено, що рівень гемолітичного ушкодження еритроцитів як 1-місячних, так і 12-місячних щурів залежить від часу інкубації в гіпертонічних розчинах сахарози та її концентрації. Значне збільшення ушкодження відбувається за концентрацій 0,5–0,8 М під час інкубації 2, 10, 30 і 60 хв (8–10 разів). Аналіз пошкодження клітин залежно від концентрації сахарози за одного і того ж часу інкубації показав, що для 10, 30, і 60 хв можна спостерігати початкове зростання чутливості, досягнення максимуму (10 хв – 0,8 М, 30 хв – 0,7 М, 60 хв – 0,6 М) і подальше її зниження як для 1-місячних, так і для 12-місячних щурів.

Встановлено, що обробка геміном підвищує рівень гіпертонічного пошкодження еритроцитів щурів 1-місячного віку після їхньої інкубації в сахарозних середовищах. Максимальна різниця в чутливості оброблених і контрольних клітин спостерігається за часу інкубації 10 хв і 30 хв (33±4 % та 18±2 %, 56±4 % та 44±3 % відповідно). Рівень пошкодження еритроцитів щурів 12-місячного віку за цих же умов змінюється незначно: для 10 і 30 хв інкубації (21±3 % та 15±2 %, 27±3 % та 23±2 %, відповідно). Оскільки гемін є модифікатором білка 4.1, змінюючи його структуру, а отже, й функцію, отримані дані вказують на важливість зв'язків білок 4.1-спектрин для підтримки механічної стабільності еритроцитів молодих тварин.

Загальний рівень гемолітичного пошкодження еритроцитів 12-місячних тварин нижчий як для контрольних, так і для модифікованих клітин після інкубації в усіх концентраціях сахарози. Відсоток гемолізу знижується у 2-3 рази.

Таким чином, еритроцити 1-місячних і 12-місячних щурів значно відрізняються за чутливістю як до модифікації геміном, так і до стресового впливу гіпертонічних розчинів сахарози. Клітини старших тварин демонструють нижчий рівень пошкодження в обох випадках. Можливо, це пов'язано з меншою доступністю макромолекулярних комплексів, що підтримують стабільність мембрани, для модифікуючого впливу геміну і середовищ із низькою іонною силою, а також різним розподілом навантаження на макромолекулярні структури, що підтримують цілісність і механічну стабільність мембрани у тварин різного віку.

Ключові слова: еритроцити щурів, гемін, сахарозне середовище, цитоскелет

Функціонально важливою особливістю еритроцита є його здатність піддаватися значним повторним деформаціям за збереження структурної цілісності. Це дає йому змогу проникати в найдрібніші капіляри, забезпечуючи тканини киснем. Численні дослідження показали, що гемореологічні чинники суттєво змінюються у процесі старіння організму

[1, 14, 16, 18, 21, 22]. У більшості досліджень повідомлялося про збільшення в'язкості плазми і цільної крові [16, 22], збільшення агрегації та порушення здатності до деформації еритроцитів у старшому віці [1, 8, 22]. Зокрема, в роботі [14] показано, що розвиток окисного стресу тісно пов'язаний із віковим статусом щурів. Так, у старших тварин підвищується рівень перекисного окиснення ліпідів, знижується вміст відновленого глутатіону, змінюється активність редокс-системи, яка допомагає клітинам реагувати на зміни окисно-відновного потенціалу. В роботах [16, 22] показано, що мікров'язкість мембран еритроцитів залежить від віку піддослідних тварин. Підвищена мікров'язкість мембрани впливає на активність інтегральних транспортних білків, відповідальних за іонний гомеостаз у клітинах. Зокрема, це може вплинути на деформованість еритроцитів і їхнє проходження через капіляри, викликає гіпоксію та провокує виникнення серцево-судинних захворювань. Дані, отримані з використанням щурів як експериментальних моделей вивчення впливу віку на параметри еритроцитів, узгоджуються зі змінами відповідних показників еритроцитів людини у процесі старіння і можуть використовуватися в геронтологічних дослідженнях [11].

Особливості вікового статусу клітини можуть мати прихований характер і проявляти себе тільки поза фізіологічною нормою, тому для виявлення їх необхідно піддати клітину стресовому впливові. Так, відомо, що стійкість еритроцитів людини та ссавців до нефізіологічних умов середовища залежить від стану структурно-функціонального комплексу цитоскелет – плазматична мембрана [2, 3, 5]. Істотну роль у цьому відіграють білки, які визначають взаємозв'язок між компонентами цитоскелету і мембраною. Модифікацію цього комплексу можна здійснювати як зміною загального стану клітини, так і більш обмеженими впливами на певні клітинні структури. Так, використання продукту окиснення гемоглобіну – геміну – призводить до модифікації макромолекулярного комплексу білок 4.1-актин-спектрин. Він визначає вузлові з'єднання мембрано-скелетної мережі, забезпечує механічну стійкість еритроцита [9, 15, 19].

Метою роботи було дослідити вікові особливості чутливості еритроцитів 1- і 12-місячних щурів до гіпертонічних умов середовища після їхньої модифікації.

Матеріали та методи

Дослідження проводили на еритроцитах самців щурів лінії Wistar 1- і 12-місячного віку. Кров одержували під час декапітації тварин під легким ефірним наркозом (стабілізатор гепарин, 500 од/мл). Роботу з тваринами проводили відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах» (V Національний конгрес із біоетики, Київ, 2013), що були узгоджені з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Еритроцити відмивали 0,01 М Na-фосфатним буфером, що містить 0,15 М NaCl, за рН=7,4, шляхом центрифугування (3000 об/хв), упродовж 5 хв, зберігали за температури 0 °С не більше години.

Для модифікації еритроцитів геміном (кінцева концентрація 20 мкМ) 30 %-ву суспензію клітин обробляли модифікатором упродовж 10 хв за температури 37 °С. Нативні та модифіковані еритроцити витримували в гіпертонічних розчинах сахарози із різною концентрацією неелектроліту (0,27–1,0 М) за 37 °С упродовж 2, 10, 30 та 60 хв.

Стійкість еритроцитів у гіпертонічних умовах середовища оцінювали за вмістом гемоглобіну в супернатанті зразків після центрифугування за 3000 об/хв упродовж 3 хв. Вміст гемоглобіну визначали спектрофотометрично за 543 нм [4]. Результати дослідження оброблені стандартними методами варіаційної статистики. Дані представлено у вигляді $M \pm m$, $n=5-6$ (середнє арифметичне значення – M ; стандартна похибка середнього арифметичного – m). Для перевірки статистичної значущості відмінностей досліджуваних

числових показників використовували критерій Манна-Вітні. Відмінності вважали значущими за $P < 0,05$.

Результати і їхнє обговорення

На рис. 1 представлено дані про рівні гемолізу еритроцитів 1-місячних щурів у гіпертонічних розчинах сахарози за різного часу інкубації. Видно, що збільшення часу інкубації обумовлює зростання пошкодження клітин. Однак ступінь наростання чутливості залежить від концентрації сахарози. Так, значне збільшення рівня гемолізу відбувається за концентрацій 0,5–0,8 М (8–10 разів). Якщо розглянути пошкодження клітин залежно від концентрації сахарози за одного і того ж часу інкубації, то для 10, 30, і 60 хв можна спостерігати початкове зростання рівня гемолітичного пошкодження, досягнення максимуму (10 хв – 0,8 М, 30 хв – 0,7 М, 60 хв – 0,6 М) і подальше зниження показників гемолізу.

Для еритроцитів 1-місячних щурів, які попередньо були модифіковані геміном, зберігаються ті ж залежності від концентрації та часу інкубації (рис. 2). Слід зазначити, що для модифікованих клітин більш виражений рівень гемолізу порівняно з контрольними еритроцитами спостерігається для 10 і 30 хв інкубації ($33 \pm 4\%$ та $18 \pm 2\%$, $56 \pm 4\%$ та $44 \pm 3\%$ відповідно).

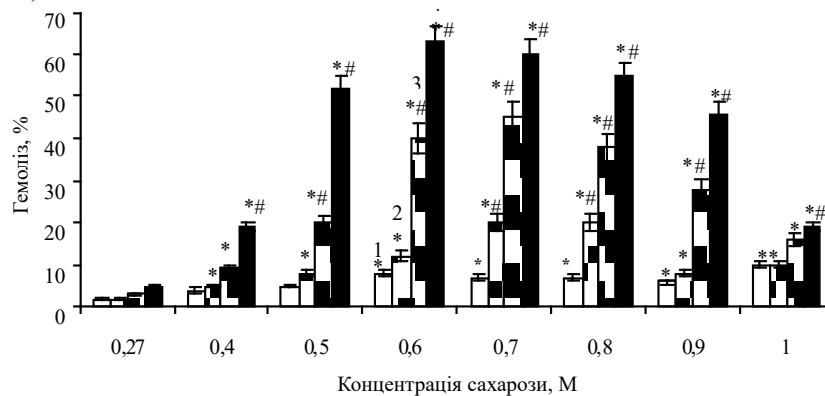


Рис. 1. Рівень гіпертонічного гемолізу еритроцитів 1-місячних щурів після інкубації у розчинах сахарози. Час інкубації: 1 – 2 хв; 2 – 10 хв; 3 – 30 хв; 4 – 60 хв

Примітка: * – різниця вірогідна, порівняно з рівнем гемолізу клітин, що не піддавалися дії гіпертонічних розчинів сахарози, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна, порівняно з рівнем гемолізу клітин, що інкубувались у гіпертонічних розчинах сахарози 2 хв, $P < 0,05$

Аналогічні результати для 12-місячних тварин представлені на рис. 3 і 4. Видно, що загальний рівень пошкодження в цьому випадку нижчий як для контрольних, так і для модифікованих клітин за усіх концентрацій сахарози. Відсоток гемолізу знижується у 2–3 рази. Крім того, чутливість контрольних і модифікованих геміном еритроцитів до дії гіпертонічних розчинів сахарози практично не відрізняється. Для 10 і 30 хв інкубації: $21 \pm 3\%$ та $15 \pm 2\%$, $27 \pm 3\%$ та $23 \pm 2\%$ відповідно.

Механічна стійкість клітини забезпечується мембранно-асоційованим білковим скелетом. Дефекти або дефіцит компонентів останнього призводять до нестабільності білкової мережі, а отже, клітини. Спрямована зміна елементів цитоскелет-мембранного комплексу дає змогу оцінити стан плазматичної мембрани під впливом різних факторів, а також вікові зміни.

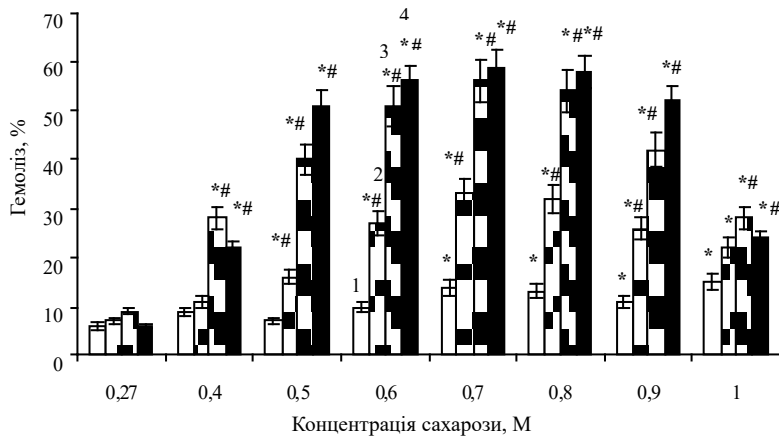


Рис. 2. Рівень гіпертонічного гемолізу модифікованих геміном еритроцитів 1-місячних щурів після інкубації у розчинах сахарози. Час інкубації: 1 – 2 хв; 2 – 10 хв; 3 – 30 хв; 4 – 60 хв

Примітка: * – різниця вірогідна, порівняно з рівнем гемолізу клітин, що не піддавалися дії гіпертонічних розчинів сахарози, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна, порівняно з рівнем гемолізу клітин, що інкубувались у гіпертонічних розчинах сахарози 2 хв, $P < 0,05$

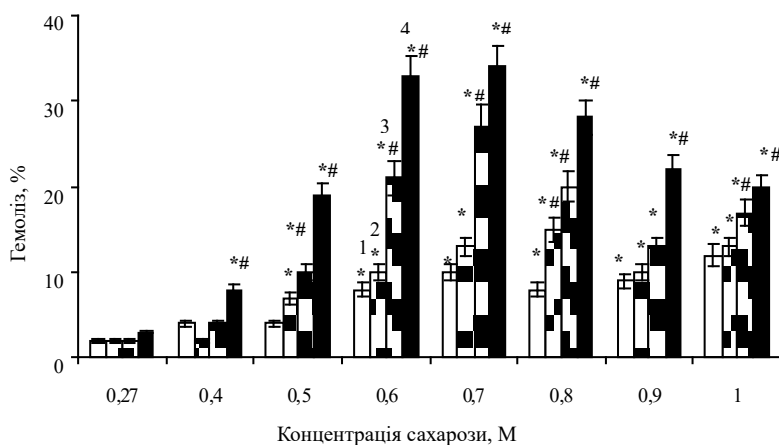


Рис. 3. Рівень гіпертонічного гемолізу еритроцитів 12-місячних щурів після інкубації у розчинах сахарози. Час інкубації: 1 – 2 хв; 2 – 10 хв; 3 – 30 хв; 4 – 60 хв

Примітка: * – різниця вірогідна, порівняно з рівнем гемолізу клітин, що не піддавалися дії гіпертонічних розчинів сахарози, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна, порівняно з рівнем гемолізу клітин, що інкубувались у гіпертонічних розчинах сахарози 2 хв, $P < 0,05$

Білок 4.1 є багатофункціональним компонентом мембрани еритроцитів. Він утворює потрійний комплекс з актином і спектрином, який визначає вузлові з'єднання мембрано-скелетної мережі, а його приєднання до трансмембранного білка глікофорину С створює місток між білковою мережею та мембранним бішаром. Відсутність білка 4.1 в еритроцитах генетично модифікованих мишей суттєво змінює структуру цитоскелета, що призводить до зменшення стабільності мембрани, її прогресуючої фрагментації *in vivo* і руйнування клітини [19]. Дія геміну на еритроцити ссавців призводить до модифікації макромолекулярного комплексу білок 4.1-актин-спектрин і, як наслідок, до часткового

відшарування мембрани від цитоскелета [4, 10]. Це може бути використано для з'ясування ролі білка 4.1 в механічній і осмотичній стабільності клітини шляхом піддавання їх гіперосмотичному стресові. Крім того, дослідження дії геміну на мембрани еритроцитів має велике значення і для клінічної медицини, зокрема, для вивчення клітинної інтоксикації [7].

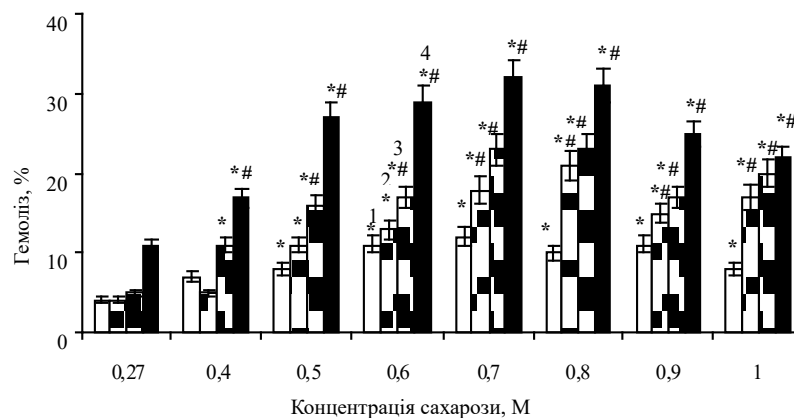


Рис. 4. Рівень гіпертонічного гемолізу модифікованих геміном еритроцитів 12-місячних щурів після інкубації у розчинах сахарози. Час інкубації: 1 – 2 хв; 2 – 10 хв; 3 – 30 хв; 4 – 60 хв

Примітка: * – різниця вірогідна, порівняно з рівнем гемолізу клітин, що не піддавалися дії гіпертонічних розчинів сахарози, $P < 0,05$; # – різниця вірогідна, порівняно з рівнем гемолізу клітин, що інкубувались у гіпертонічних розчинах сахарози 2 хв, $P < 0,05$

Гемін є продуктом окиснення гемоглобіну. Фізіологічно концентрація вільного геміну в крові строго регулюється високоафінним зв'язуванням з білками, такими як альбумін сироватки крові, гаптоглобін і гемопексин. Патологічно високі рівні вивільнення геміну виникають за важких гемолітичних станів, таких як серпоподібно-клітинна анемія або таласемія. Гемін також утворюється в умовах кровотечі при виразках і ерозіях шлунка під дією ферментів шлункового соку та соляної кислоти на гемоглобін. Багато чинників, що призводять до окиснення і руйнування мембран, утворення метгемоглобіну (наприклад, іонізуюче випромінювання), також збільшують ймовірність появи геміну в організмі. Крім того, препарати геміну використовуються для лікування порфірії [7]. Вільний гем, що є ліпофільною молекулою, проникає в мембрану, порушує ліпідний бішар і дестабілізує цитоскелет [4, 9, 10, 13, 15].

Можна припустити, що еритроцити, модифіковані геміном, будуть більш чутливі до стресового осмотичного впливу. Справді, обробка геміном підвищує чутливість еритроцитів до гіпертонічних сахарозних середовищ у щурів 1-місячного віку (рис. 1 і 2). Оскільки гемін є модифікатором білкового комплексу білок 4.1-актин-спектрин, це може вказувати на важливість зв'язків білок 4.1-актин-спектрин для підтримки механічної стабільності еритроцитів молодих тварин. Однак при цьому чутливість еритроцитів щурів 12-місячного віку не зазнає змін. Це можна пояснити меншою кількістю геміну, який проникає в еритроцити старших тварин. У роботі [11] повідомлялося, що в еритроцитах літніх людей (понад 60 років) спостерігається значне збільшення вмісту холестерину в мембранах, а також зміна кількісного складу фосфоліпідів і їхнього розташування, що призводить до зниження їхньої плинності. Оскільки гемін є ліпофільною молекулою, зміна складу мембран може суттєво обмежувати його проникнення всередину клітини [10]. Крім того,

в підтримці стабільності еритроцитів старших тварин, імовірно, можуть брати участь інші білкові комплекси. Так, у роботі [19] визначено два типи мультипротеїнових комплексів, що утворюють зв'язок між мембранним скелетом і бішаром. А саме, крім макромолекулярного комплексу на основі білка 4.1, є ще макромолекулярний комплекс на основі білка смуги 3, який приєднується через анкірин до тетрамеру спектрину. Слід зазначити, що максимальна різниця в чутливості оброблених і контрольних клітин спостерігається за часу інкубації 10 хв і 30 хв. Мабуть, 2 хв недостатньо для розвитку гіпертонічного ушкодження клітини, а за 60 хв пошкодження настільки значне, що модифікація геміном комплексу білок 4.1-актин-спектрин не має впливу на загальну стабільність еритроцита.

Аналізуючи чутливість еритроцитів до дії гіпертонічних сахарозних розчинів (рис. 1–2) можна побачити, що вона має максимум за концентрації сахарози 0,6 М, що може вказувати на наявність двох різноспрямованих процесів, один із яких підвищує рівень вивільнення гемоглобіну, інший – знижує. Сумарна дія цих процесів визначає чутливість клітин до гіпертонічного впливу. Так, з одного боку, зі збільшенням концентрації сахарози відбувається швидша дегідратація еритроцита, прискорюється дисоціація мембрани і цитоскелета [17], що призводить до фатальних порушень цілісності клітини і до її незворотного пошкодження. З іншого боку, за подальшого збільшення концентрації сахарози може значно змінюватися заряд білкових молекул, що призводить до зв'язування молекул гемоглобіну з білками цитоскелета (зокрема, спектрином) і до формування великих комплексів [6, 20, 23]. Це знижує концентрацію вільного гемоглобіну і зумовлює викривлення показників рівня ушкодження клітини, занижуючи їх.

За збільшення часу інкубації в сахарозі ступінь пошкодження наростає не тільки для модифікованих, а й для контрольних клітин. Це може бути пов'язано з низькою іонною силою середовища. Значення іонної сили відіграє важливу роль у структурі та конформації спектрину еритроцитів. Як показано раніше за допомогою електронної мікроскопії та гідродинамічних досліджень [12], димер спектрину змінює свою конформацію за зниження іонної сили середовища стосовно фізіологічної. Унаслідок цього відбувається дисоціація зв'язків мембрано-цитоскелетного комплексу, а саме зв'язку спектрин-актин. Це призводить до поступового відділення мембрани від цитоскелета, дестабілізації та руйнування клітини.

Таким чином, спостерігається розходження між чутливістю еритроцитів 1-місячних і 12-місячних щурів як до модифікації геміном, так і до стресового впливу гіпертонічних розчинів сахарози. Клітини старших тварин демонструють нижчий рівень пошкодження в обох випадках. Це, швидше за все, пов'язано з меншою доступністю макромолекулярних комплексів, що підтримують стабільність мембрани, для модифікуючого впливу геміну і дії середовищ із низькою іонною силою, а також із різним розподілом навантаження на вузлові білкові структури мембрани у тварин різного віку. Крім того, зростання інтенсивності процесів окиснення в мембрані еритроцита з віком призводить до збільшення кількості зв'язків гемоглобін-спектрин, знижуючи здатність мембрани еритроцитів до деформації, однак збільшуючи їхню осмотичну і механічну стійкість.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Березнякова А. І., Жемела О. Д. Здатність до деформації мембран еритроцитів у щурів різного віку при гіпоксії // *Фізіол. журнал*. 2013. Т. 59 № 3. С. 72–77.
2. Коба Л. В., Шапкіна О. О., Жуйкова А. Є., Бондаренко В. А. Стійкість еритроцитів щурів різного віку до гіпертонічних умов середовища // *Вісн. проблем біології і медицини*. 2018. Вип. 3 (145). С. 389–392.

3. *Луговський С. П.* Вікові особливості шкідливої дії малих доз свинцю на еритроцити щурів при його тривалому впливі на організм // Довкілля та здоров'я. 2010. № 4. С. 17–22.
4. *Олейник О. А., Рамазанов В. В., Бондаренко В. А.* Постгипертонический лизис модифицированных эритроцитов в цитратной среде // Проблемы криобиологии. 2003. № 3. С. 21–29.
5. *Шпакова Н. М., Орлова Н. В., Нупот Е. Е.* та ін. Осмотическая чувствительность эритроцитов млекопитающих при модификации их исходного состояния // Вестн. проблем биологии и медицины. 2016. Вып. 2. Т. 3 (130). С. 356–361.
6. *Basu A., Chakrabarti A.* Hemoglobin interacting proteins and implications of spectrin hemoglobin interaction // J. Proteomics. 2015. Vol. 128. P. 469–475.
7. *Belcher John D., Beckman Joan D., Balla Gyorgy* et al. Heme degradation and vascular injury // Antioxid Redox Signal. 2010. Vol. 1. N 2. P. 233–248.
8. *Ciana A., Achilli C., Minetti G.* Spectrin and other membrane-skeletal components in human red blood cells of different age // Cell Physiol. Biochem. 2017. Vol. 42. N 3. P. 1139–1152.
9. *Das D., Patra M., Chakrabarti A.* Binding of hemin, hematoporphyrin, and protoporphyrin with erythroid spectrin: fluorescence and molecular docking studies // Eur. Biophys. J. 2015. Vol. 44. N 3. P. 171–182.
10. *Das D., Tarafdar P. K., Chakrabarti A.* Structure-activity relationship of heme and its analogues in membrane damage and inhibition of fusion // FEBS Letters. 2018. Vol. 592. N 14. P. 2458–2465.
11. *Gonzalez L. M., Moeser A. J., Blikslager A. T.* Animal models of ischemia-reperfusion-induced intestinal injury: progress and promise for translational research // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2015. Vol. 308. P. 63–75.
12. *Kelkar D. A., Chattopadhyay A., Chakrabarti A., Bhattacharyya M.* Effect of ionic strength on the organization and dynamics of tryptophan residues in erythroid spectrin: A fluorescence approach // Biopolymers. 2005. Vol. 77. N 6. P. 325–334.
13. *Kozlova E., Chernysh A., Moroz V.* et al. Transformation of membrane nanosurface of red blood cells under hemin action // Sci Rep. 2014. Vol. 4. N 6033. P. 1–11.
14. *Kumar D., Rizvi S. I.* Markers of oxidative stress in senescent erythrocytes obtained from young and old age rats // Rejuvenation Res. 2014. Vol. 17. N 5. P. 446–452.
15. *Matthews K., Duffy S. P., Myrand-Lapierre M. E.* et al. Microfluidic analysis of red blood cell deformability as a means to assess hemin-induced oxidative stress resulting from *Plasmodium falciparum* intraerythrocytic parasitism // Integr. Biol. (Camb). 2017. Vol. 9. N 6. P. 519–528.
16. *Mester A., Magyar Z., Molnar A.* Age- and gender-related hemorheological alterations in intestinal ischemia-reperfusion in the rat // J. Surg. Res. 2018. Vol. 225. P. 68–75.
17. *Moersdorf D., Egee S., Hahn C.* Transmembrane potential of red blood cells under low ionic strength conditions // Cell Physiol. Biochem. 2013. Vol. 31. N 6. P. 875–882.
18. *Rebrova T. Y., Afanasiev S. A., Popov S. V.* Age-dependent changes in Na(+),K(+)-ATPase activity and lipid peroxidation in membranes of erythrocytes during cardiosclerosis development in rats // Bull Exp. Biol. Med. 2016. Vol. 161. N 2. P. 235–236.
19. *Salomao M., Zhang X., Yang Y.* et al. Protein 4.1R-dependent multiprotein complex: New insights into the structural organization of the red blood cell membrane // Proc Natl Acad. Sci. USA. 2008. Vol. 105. N 23. P. 8026–8031.
20. *Sauberman N., Fortier N. L., Joshi W.* et al Spectrin-haemoglobin crosslinkages associated with in vitro oxidant hypersensitivity in pathologic and artificially dehydrated red cells // British. J. Haematol. 2008. Vol. 54. N 1. P. 15–28.
21. *Singh S., Pandey K. B., Rizvi S. I.* Erythrocyte senescence and membrane transporters in young and old rats // Arch. Physiol. Biochem. 2016. Vol. 122. N 4. P. 228–234.

22. *Somogyi V., Peto K., Deak A.* Effects of aging and gender on micro-rheology of blood in 3 to 18 months old male and female Wistar (CrI:WI) rats // *Biorheology*. 2018. Vol. 54. N 5–6. P. 127–140.
23. *Welbourn E. M., Wilson M. T., Yusof A.* et al. The mechanism of formation, structure and physiological relevance of covalent hemoglobin attachment to the erythrocyte membrane // *Free Radic. Biol. Med.* 2017. Vol. 103. P. 95–106.

Стаття: надійшла до редакції 06.03.19

доопрацьована 25.09.19

прийнята до друку 04.10.19

SENSITIVITY OF DIFFERENT AGE RATS ERYTHROCYTES TO STRESS

L. Koba¹, O. Nipot², O. Shapkina², A. Zhujkova¹, V. Bondarenko¹

¹*V.N Karazin Kharkiv National University
4, Svobody Sq., Kharkiv 61022, Ukraine*

²*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, NAS of Ukraine
23, Pereyaslavska St, Kharkiv 61016, Ukraine
e-mail: nipotel71@gmail.com*

In this work age features of 1- and 12-month rats erythrocytes sensitivity to hypertonic conditions of environment after their modification by hemin.

It has been shown that the level of hemolytic damage of erythrocytes in both 1-month and 12-month rats depends on the time of incubation in hypertonic solutions of sucrose and their concentration. For incubations for 2, 10, 30, and 60 minutes significant increase in damage occurs at concentrations of 0.5–0.8 M (8–10 times). The analysis of cell damage, depending on the concentration of sucrose at the same incubation time, showed that for 10, 30, and 60 minutes it is possible to observe the initial increase in sensitivity, achievement of maximum (10 min – 0.8 M, 30 min – 0.7 M, 60 min – 0.6 M) and further reduction erythrocytes damage in both 1-month and 12-month rats.

It was found that gemin treatment increases the level of hypertonic damage of erythrocytes after incubation in sucrose environments for 1 month old rats. At the same time, the maximum difference in the sensitivity of treated and control cells is observed at incubation time of 10 min and 30 min (33±4 % and 18±2 %, 56±4 % and 44±3 % respectively). The level of erythrocyte damage in 12-month-old rats in these conditions does not change. For 10 and 30 minutes incubation (21±3 % and 15±2 %, 27±3 % and 23±2 % respectively). Since hemin modifies protein 4.1, the data indicate the importance of 4.1-spectrum protein bonds to support the mechanical stability of red blood cells in young animals.

Overall level of hemolytic damage of erythrocytes for 12-month-old animals is lower for both control and modified cells for all concentrations of sucrose. The percentage of hemolysis is reduced from two to three times.

Thus, erythrocytes of 1-month and 12-month-old rats differ significantly in sensitivity, both to modification by hemin, and to the stressful effects of hypertonic sucrose solutions. Senior animal cells exhibit a lower level of damage in both cases. This can be explained by the lower availability of macromolecular complexes that support the stability of the membrane, for modifying the influence of hemin and low ionic strength media, as well as the different distribution of strain on macromolecular structures that maintain the integrity and mechanical stability of the membrane in animals of all ages.

Keywords: erythrocytes of rats, hemin, sucrose medium, cytoskeleton