

<sup>1</sup>А.В. Коцюруба, <sup>1</sup>Б.С. Коп'як, <sup>1</sup>В.Ф. Сагач, <sup>2</sup>О.Б. Щербаков, <sup>2</sup>Н.М.Жолобак, <sup>2,3</sup>М.Я. Співак

## Відновлення наночастинками діоксиду церію стійкості еритроцитів старих щурів до кислотного гемолізу

<sup>1</sup>Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ; <sup>2</sup>Ін-т мікробіології і вірусології ім Д.К. Заболотного, НАН України, Київ; <sup>3</sup>ТОВ «Діапроф»; E-mail: [toliko49@ukr.net](mailto:toliko49@ukr.net)

*У досліджах in vivo та in vitro вивчали дію нанодисперсного діоксиду церію (НДЦ) на стійкість еритроцитів старих щурів до кислотного гемолізу, який викликали проникненням протонів у матрикс еритроцитів. Показано in vivo значне зниження індексу стійкості еритроцитів крові, тривалості їх повного гемолізу, часу максимального гемолізу, частки лабільних „старих” і, навпаки, зниження частки стабільних „молодих” еритроцитів порівняно з дорослими щурами. Введення per os протягом 14 діб в організм старих щурів 0,1 мг/кг НДЦ повністю відновило стійкість їх еритроцитів до кислотного гемолізу. При цьому значно знижувалася в циркуляції частка „старих” лабільних еритроцитів і, навпаки, значно зростала частка „молодих” надстабільних еритроцитів, що свідчить про відчутний „омолоджувальний” ефект НДЦ. Досліди in vitro показали відсутність прямої гемолітичної дії НДЦ у концентрації  $10^{-3}$ – $10^{-12}$  моль/л.*

*Ключові слова: еритроцити, кислотний гемоліз, старі щури, нанодисперсний діоксид церію.*

### ВСТУП

В організмі людини щохвилини утворюється і гине близько 150 млн еритроцитів. Від інтенсивності цих процесів і їх динамічної рівноваги залежить кількість циркулюючих еритроцитів, що забезпечує тканини киснем, а при її зниженні – підвищує вимоги до скоротливої та насосної функцій серця. У фізіологічних умовах така рівновага визначається еритропоезом та ериптозом [1]. Останній ініціюється надходженням до клітини іонів кальцію і залежить від стійкості мембран еритроцитів до таких пошкоджувальних агентів, як оксидативний стрес, енергетична недостатність, гіпертермія тощо. Оксидативний стрес є найбільш відомим тригером ериптозу [2]. Можливо, у зв'язку зі значним підсиленням вільнорадикальних процесів з віком і пов'язано зниження стійкості еритроцитів до пошкоджувальних агентів, що

спостерігається у старих організмів [3–5] (яка може відновлюватися введенням антиоксидантів [6]). Одним з найбільш поширених в організмі пошкоджувальних агентів для мембран еритроцитів є закиснення середовища у зв'язку з порушенням тканинного дихання (гіпоксія, ішемія тощо), тому як тест на стійкість мембран еритроцитів було обрано відомий кислотний гемоліз.

Раніше [7] нами було показано одночасне зі зниженням артеріального тиску внаслідок відновлення ендотеліозалежної скоротливої активності гладеньких м'язів грудної аорти, значне підвищення стійкості еритроцитів старих щурів до кислотного гемолізу після багаторазового опромінення червоним лазером. Це свідчить про залежність артеріального тиску від фізико-хімічних властивостей плазматичної мембрани циркулюючих ери-

троцитів крові. Цей феномен підтверджує важливу їх роль і в регуляції серцево-судинної системи організму (хоча б унаслідок потужного реутилізаційного синтезу NO [8], а не лише, що відомо, імунної системи [9]. Важливою є також наявність прямої кореляції між інтенсивністю гемолізу еритроцитів крові і набуханням мітохондрій [10] для вивчення вазо-і кардіопротекторних механізмів дії нових неорганічних матеріалів. Нами було проведено на еритроцитах піонерське дослідження в Україні біоефектів наномагнетиту з іммобілізованим екдистероном [11], який, як пізніше виявилось [12], є потужним інгібітором і  $\text{Ca}^{2+}$ -, і радикалзалежного відкриття мітохондріальної пори, значно підвищеного в мітохондріях серця старих щурів. За останні роки значно зріс інтерес до вивчення біоефектів наночерію – нанокристалічного діоксиду церію (НДЦ) – поліфункціонального неорганічного матеріалу, який нині широко застосовується в медицині (кардіологія, офтальмологія, онкологія тощо) за рахунок надпроникливості через мембрани клітин і величезної поверхні з унікальними властивостями [13–16], але вплив його на еритроцити крові не вивчений.

Мета нашої роботи – дослідження дії НДЦ на кислотний гемоліз еритроцитів у старих щурів, більшість з яких мають високу здатність до гемолітичного руйнування плазматичної мембрани.

## МЕТОДИКА

Досліди проводили на 10 дорослих безпородних щурах віком 6 міс і 10 старих віком 24 міс. Старих щурів розділяли на дві групи по 5 тварин у кожній. Щурам контрольної групи згодовували протягом 14 діб стандартний раціон віварію, а в питну воду добавляли лише буфер, у якому розчиняли НДЦ, тоді як тваринам дослідної групи у питну воду додавали суспензію НДЦ у буфері з розрахунку по 0,1 мг/кг. Через 14 діб тварин декапітували, відбирали кров, з якої виділяли

еритроцити центрифугуванням при  $1500 \text{ хв}^{-1}$  протягом 30 хв. Суспензію еритроцитів крові дорослих, контрольних і дослідних старих щурів в ізотонічному середовищі 0,14 М NaCl використовували для проведення кінетичного аналізу кислотного гемолізу для оцінки мембраностабілізуючої дії НДЦ. Суть методу полягає у визначенні кількості клітин, що гемолізуються під дією слабкої кислоти (0,004 N HCl) за певний проміжок часу. В дослідах *in vitro* еритрограми фіксували при різних концентраціях ( $10^{-3}$ – $10^{-12}$  моль/л) НДЦ у суспензії еритроцитів дорослих щурів.

Всі роботи з тваринами проводили відповідно до Закону України від 21.02.2006 №3447-IV „Про захист від жорстокого поводження” та згідно з етичними нормами і правилами роботи з лабораторними тваринами.

*Мембранопротекторна дія НДЦ у дослідах in vivo.* Кислотна резистентність характеризує цілісність мембрани еритроцитів і ступінь її пошкодження за дії різних факторів у період старіння. Її оцінювали за кінетичними показниками гемолізу, що індукували 0,004 N HCl [17]. Гемоліз реєстрували спектрофотометрично, визначаючи кількість зруйнованих клітин через рівні проміжки часу (30 с) за зміною інтегрального світлорозсіювання суспензії еритроцитів при  $\lambda=750$  нм. Кислотний лізис еритроцитів ініціювали, вносячи 2 мл 0,004N розчину HCl у скляну кювету спектрофотометра (1 см), в яку попередньо поміщали 2 мл їх суспензії з густиною еритроцитів близько  $0,7 \cdot 10^{-6}$  клітин на 1 мл. При такій густині інтегральне світлорозсіювання, що залежить від числа, розмірів і форми клітин, пропорційне числу клітин у суспензії. Тривалість гемолізу окремого еритроцита не перевищує 10 с, тому 30-секундний інтервал між вимірами екстинції гарантує неможливість врахувати його двічі. Виходячи з цього, ми вираховували відсоток розподілу еритроцитів за групами стійкості, реєструючи еритрограми кожного зразка суспензії. Стійкість кожної фракції еритроцитів можна характеризувати часом її виявлення на

еритрограмі, а в цілому еритрограму (див. рисунок) оцінювали за такими кінетичними показниками, як:

- час початку кислотного гемолізу ( $t_0$ );
- час завершення гемолізу ( $t_k$ );
- загальна тривалість гемолізу ( $\Delta t = t_k - t_0$ ), що визначає з одного боку, стан плазматичної мембрани еритроцитів (проникність для протонів), а з іншого – напруженість еритропоезу для дослідів *in vivo*;

- максимум кінетичної кривої ( $t_{max}$ ), що характеризує стабільність основної популяції еритроцитів у цьому зразку крові. Зсув максимуму вліво на осі часу вказує на зниження стабільності і, навпаки, зсув вправо – її зростання. Поява високостабільних чи низькостабільних фракцій свідчить про гетерогенність популяції еритроцитів за показниками стабільності плазматичної мембрани до кислотного гемолізу;

- відсоток максимального гемолізу еритроцитів, кількість еритроцитів, що гемолізуються на максимумі кінетичної кривої.

- відсоток лабільних „старих” еритроцитів – відносна кількість еритроцитів у циркуляції, які гемолізуються за перші 2,5 хв гемолізу;

- відсоток стабільних „молодих” еритроцитів – відносна кількість еритроцитів у циркуляції, які гемолізуються після 7,5 хв гемолізу;

- індекс стійкості еритроцитів (I) що є інтегральним числом, яке характеризує гемолітичну стійкість усієї популяції еритроцитів конкретного дослідного зразка, визначали, додаючи добутки кількості клітин, що гемолізували у цей період ( $\alpha_i$ ) на  $t_i$  ( $I = \sum \alpha_i \cdot t_i$ ).

*Гемолітична дія НДЦ у дослідах in vitro.* Для оцінки можливої мембранопшкоджувальної (гемолітичної) дії НДЦ визначали кислотну резистентність еритроцитів крові дорослих щурів за наявності  $10^{-3}$ – $10^{-12}$  моль/л НДЦ.

Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики з використанням програм Excell (MS Office XP), SDUDENT (MS Excell) та Origin 6.0 («Microcall Inc.», США)

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Зрілі еритроцити щурів, як і людини – клітини дископодібної двояковвігнутої форми, розмір і еластичність яких допомагають їм рухатися по капілярах, а форма підвищує площу поверхні та полегшує газообмін. У них відсутнє ядро і мітохондрії. У кістковому мозку в процесі еритропоезу кожену секунду утворюється понад 2 млн нових „молодих” еритроцитів, стійких до гемолізу. Вони циркулюють у крові близько 100–120 діб, перетворюючись у „старі” клітини з підвищеною здатністю до гемолізу. Непшкоджені старі клітини поглинаються макрофагами унаслідок ериптозу (апоптозу еритроцитів), що не супроводжується руйнуванням плазматичної мембрани і виходом у плазму гемоглобіну і аденозинтрифосфату.

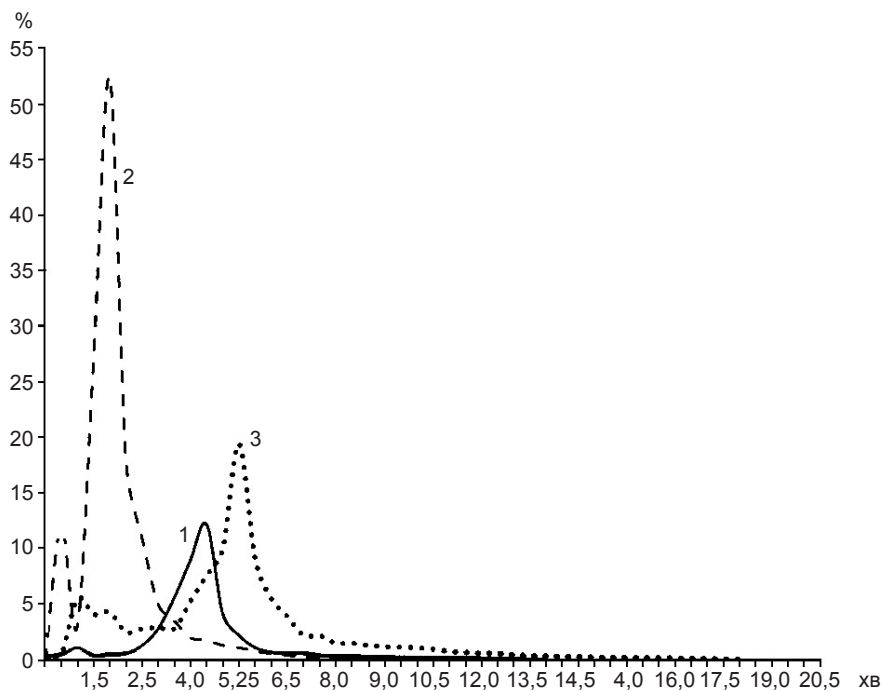
Позаяк стійкість еритроцитів до кислотного гемолізу (некрозу еритроцитів) визначається проникністю плазматичної мембрани клітин для протонів, речовини, що її інгібують, збільшуватимуть стійкість, а речовини, що збільшують проникність, навпаки, знижуватимуть її. При осмотичному гемолізі еритроцити набухають і перетворюються у круглі сфероцити (цей процес називається сферуляція) унаслідок проникнення води. Надмірне набухання руйнує плазматичну мембрану. При швидкому кислотному гемолізі еритроцитів у старих щурів мембрани дискоцитів можуть руйнуватися і без переходу у форму сфероциту. За ериптозу, що викликається входом  $Ca^{2+}$  у цитозоль клітин, еритроцити не набухають, а, навпаки, „зморщуються”.

На рисунку представлено усереднені кислотні еритрограми еритроцитів щурів різних досліджених груп. У контрольних старих щурів (крива 2) максимум кривої гемолізу зміщено ліворуч, а у тих, що отримували НДЦ (крива 3), навпаки – праворуч від кривої гемолізу дорослих тварин (крива 1). На основі індивідуальних кислотних еритрограм розраховували показники, середні значення яких представлено в таблиці.

У старих щурів частка лабільних („старих”) еритроцитів, які гемолізуються менше ніж за 2,5 хв, становить 63,3 %, що більш ніж у 5 разів більше, ніж у дорослих щурів (12,6 %; див. таблицю). Це зумовлюється легкою проникністю протонів крізь мембрану (через аніонний канал або за рахунок кальційпротонного обміну внаслідок „виходу”  $\text{Ca}^{2+}$  із еритроцитів) у значній кількості клітин (їх мембрана більш проникна для протонів). Такі еритроцити матимуть менший життєвий цикл, швидше руйнуватимуться та викидатимуть назовні АТФ у неконтрольованій великій кількості, що зумовлюватиме менший відсоток еритроцитів, які будуть доносити кисень до тканин, а це може спричиняти виникнення гіпоксичного стану. Короткочасне (протягом 14 діб) введення НДЦ повністю нормалізує (зменшує) частку лабільних „старих” еритроцитів у крові старих щурів. Отже, наноцерій або надзвичайно мінімалізує проникність для протона крізь плазматичну мембрану «старих» лабільних еритроцитів, які циркулювали, або значно стимулює викид у циркуляцію

нових „молодих” еритроцитів, впливаючи на інтенсивність еритропоезу. Про можливу стимуляцію еритропоезу за дії НДЦ свідчить значне (більш ніж у 18 разів) збільшення в крові частки стабільних („молодих”) еритроцитів із малопроникною для протона мембраною (див. таблицю). При цьому у старих щурів достовірно підвищується тривалість кислотного гемолізу (від  $8,3 \pm 1,1$  до  $19,4 \pm 3,1$  хв), час закінчення гемолізу (від  $6,3 \pm 1,1$  до  $20,0 \pm 2,8$  хв) і зростає (від  $190,1 \pm 23,4$  до  $693,8 \pm 74,7$  ум.од.) інтегральний індекс стійкості еритроцитів (див. таблицю).

Загальні молекулярні механізми пошкодження еритроцитів за кислотного гемолізу залишаються нез’ясованими. Раніше було показано, що внаслідок зниження рН зовнішнього середовища глікокалікс на мембрані еритроцитів трансформується в пори, що спричиняє її дестабілізацію з наступним лізісом еритроцитів. Згідно з Zavodnjuk і співавт. [18], лізис еритроцитів у кислому середовищі включає три основні стадії: проникнення протонів через плазматичну мемб-



Усереднені кислотні еритрограми еритроцитів дорослих (1), старих (2) та старих щурів, що отримували наноцерій (3). За віссю абсцис – тривалість, за віссю ординат – рівень гемолізу

## Кінетичні кислотні еритрограми щурів (M ± m)

Показник	Дорослі щури (норма, n=10)	Старі щури (контроль, n=5)	Старі щури, які отримували наноцерій (n=5)
Початок гемолізу ( $t_0$ ), хв	0,3 ± 0,04	0 ± 0	0,6 ± 0,08*
Тривалість гемолізу ( $\Delta t$ ), хв	13,8 ± 1,6	8,3 ± 1,1*	19,4 ± 3,1**
Відсоток максимального гемолізу, %	12,1 ± 1,44	52,41 ± 7,49*	19,44 ± 1,84**
Час максимального гемолізу $t_{max}$ , хв	4,40 ± 0,46	1,70 ± 0,32*	5,20 ± 0,07**
Частка лабільних клітин (гемоліз до 2,5 хв), %	12,06 ± 1,38	63,3 ± 12,94*	7,17 ± 1,13**
Частка стабільних клітин гемоліз (після 7,5 хв), %	28,1 ± 3,1	1,51 ± 0,22*	27,56 ± 3,64**

рану еритроцитів, протонування гемоглобіну та білків мембрани і, як наслідок останнього, осмотичне їх руйнування.

Використовуючи метод кислотного гемолізу, ми мали змогу отримати інформацію про структурну організацію плазматичної мембрани найчисленніших клітин організму – еритроцитів і взаємодії, що її стабілізують чи дестабілізують при старінні, а також оцінити дію НДЦ на кінетику проходження протона через плазматичну мембрану еритроцитів, що залежить від стану її нативності. Раніше нами показано збільшення утворення радикалів кисню й азоту в еритроцитах старих щурів [8], не виключено, що спостережувана нами відновлювальна дія НДЦ на їх гемоліз також реалізується через інгібування процесів генерації радикалів кисню і/чи азоту як у самих клітинах, так і в оточуючому їх середовищі – плазмі крові, білих клітинах крові чи в ендотелії судин. Отже, дослідження *in vivo* показали здатність НДЦ відновлювати стабільність еритроцитів старих щурів до кислотного гемолізу, тобто їхнє значне „омолодження”, внаслідок можливого інгібування проникнення протона через плазматичну мембрану. Останнє може бути наслідком як прямої дії НДЦ на еритроцити (інгібування процесу транспорту протона через аніонний канал або кальцій-протонний обмінник),

так і опосередкованої, через стимуляцію еритропоезу. Показано також ефективність кінетичного методу визначення кислотної резистентності еритроцитів для встановлення фармакологічних властивостей НДЦ як *in vitro*, так і, особливо, *in vivo* і безсумнівно засвідчено потужні мембраностабілізуювальні властивості НДЦ. Простота й ефективність кінетичного методу визначення кислотної резистентності еритроцитів за різних фізіологічних станів організму в досліджах *in vivo*, а також за наявності пошкоджувальних чи стабілізуювальних агентів дають змогу рекомендувати його для широкого використання в наукових дослідженнях і в практичній медицині.

## ВИСНОВКИ

1. Старіння організму супроводжується значним зниженням у циркуляції крові частки стабільних до кислотного гемолізу („молодих”) еритроцитів і, навпаки, значним підвищенням частки лабільних („старих”) еритроцитів із легкою проникністю для протонів.

2. Встановлено *in vivo*, що неорганічні частинки нанодисперсного діоксиду церію (НДЦ) відновлюють стійкість еритроцитів крові старих щурів до кислотного гемолізу внаслідок значного зростання в циркуляції частки стійких до нього „молодих” еритроци-



тів. і, навпаки, зниженням частки лабільних «старих» клітин.

3. Стимуляції кислотного гемолізу при додаванні в гемолізуюче середовище НДЦ в діапазоні концентрацій  $10^{-3}$ – $10^{-12}$  моль/л не відбувається.

**А.В. Коцюрuba, Б.С. Копьяк, В.Ф. Сагач,  
О.Б. Щербакoв, Н.М.Жолобак, Н.Я. Спивак**

### **ВОССТАНОВЛЕНИЕ НАНОЧАСТИЧКАМИ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ СТАРЫХ КРЫС К КИСЛОТНОМУ ГЕМОЛИЗУ**

В опытах in vivo и in vitro исследовали действие нанодисперсного диоксида церия (НДЦ) на устойчивость эритроцитов старых крыс к кислотному гемолизу. Проведен анализ кинетических кривых кислотного гемолиза, вызываемого проникновением протонов в матрикс эритроцитов. В опытах in vivo показали значительное снижение индекса устойчивости эритроцитов, продолжительности их полного гемолиза, времени максимального гемолиза, значительное увеличение доли лабильных «старых» и, наоборот, снижение доли стабильных «молодых» эритроцитов у старых животных по сравнению со взрослыми. Введение старым животным per os в течение 14 сут 0,1 мг/кг НДЦ полностью возобновило устойчивость их эритроцитов к кислотному гемолизу. При этом значительно снижалась в циркуляции доля «старых» лабильных эритроцитов и, наоборот, значительно возрастала доля «молодых» стабильных эритроцитов, что свидетельствует об ошутимом «омолаживающем» эффекте НДЦ. Опыты in vitro показали отсутствие прямого гемолитического действия НДЦ в концентрациях  $10^{-3}$ – $10^{-12}$  моль/л. Ключевые слова: эритроциты, кислотный гемолиз, старые крысы, нанодисперсный диоксид церия .

**A.V. Kotsuruba, B.S. Kopjak, V.F. Sagach,  
A.V. Shcherbakov, N.M.Zholobak, N.JA.Spivak**

### **RESTORATION OF ERYTHROCYTES STABILITY TO ACID HEMOLYSIS BY CERIUM OXIDE NANOPARTICLES IN OLD RATS**

In experiments in vivo and in vitro we investigated the effect of cerium oxide nanoparticles on the stability of red blood cells of old rats. The analysis of the kinetic curves of acid hemolysis caused by the penetration of protons into the matrix of erythrocytes in experiments in vivo showed a significant reduction in the so-called stability index, the times of duration of complete hemolysis, the time of hemolysis maximum, the fate of labile “old” and, conversely, decreased the fate of “young” erythrocytes in old animals blood compared with adults. Introduction to old rats per os for 14 days 0.1 mg /

kg of cerium oxide nanoparticles fully restored resistance of erythrocytes to acid hemolysis. Cerium oxide nanoparticles decreased in circulation the fate of labile “old” erythrocytes and, conversely, significantly increased the fate of “young” stable erythrocytes. Experiments in vitro showed no direct hemolytic action of cerium oxide nanoparticles at concentrations –  $10^{-3}$  M -  $10^{-12}$  M.

Key words: erythrocytes, acid hemolysis, old rats, cerium oxide nanoparticles.

*Bogomoletz Institute of physiology NAS of Ukraine, Kyiv;  
Institute of microbiology and virusology NAS of Ukraine, Kyiv;  
LCL «Diaprof».*

### **REFERENCES**

1. Lang F, Quadri SM. Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes. *Blood Purif.* 2012;33(1-3):125-30.
2. Lang F, Abed M, Lang E, Föller M. Oxidative stress and suicidal erythrocyte death. *Antioxid Redox Signal.* 2014;21(1):138-53.
3. Renha-Silva N, Firmino CB, de Freitas Reis FG, da Costa Huss JC, de Souza TM, de Freitas MV, Netto RC Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes . *Mech Ageing Dev.* 2007;128(7-8):444-9.
4. Ghashghaeinia M, Cluitmans JC, Akel A, Dreischer P, Toulany M, Koberie M et al. The impact of erythrocyte age on eryptosis. *Br J Haematol.* 2012;157(5):606-14.
5. Wang Y, Liu XS Mechanisms of aging and programmed death of erythrocytes. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi .* 2014; 22(4):1124-8.
6. Qadri SM, Föller M, Lang F. Inhibition of suicidal erythrocyte death by resveratrol. *Life Sci.* 2009; 85(1-2):33-8.
7. Fedorov SM, Baziljuk OV, Kotsuruba AV, Korkach YuP, Sagach VF. Magnetic-Laser influence on the system of nitric oxide and contractile activity of smooth muscles of rat aorta under hypertension. *Fiziologichnyj Zhurnal.* 2012; 58( 6):36–47. [Ukrainian].
8. Sagach VF, Baziljuk OV, Stepanenko LG, Korkach YuP, Kotsuruba AV. Enalapril action on nitric oxide synthesis, oxidative metabolism and vascular tone of aging rat. *Fiziol Zh. .* 2007;53(4):15–26. [Ukrainian].
9. Prokopenko LG, Siplivaja LE. Erythrocytes as modulators of immune reactions. *Usp Physiol Nauk .* 1992; 23(4):89-106. [Russian].
10. Goodall AH, Fisher D, Lucy JA. Cell fusion, haemolysis and mitochondrial swelling induced by retinol and derivatives . *Biochem. Biophys. Acta.*1980; 595(1): 9-14.
11. Mykhaylyk O, Kotsuruba A, Dudchenko N, Tozok G. Signal transduction by erythrocytes on specific binding of doxorubicin immobilized on nano dispersed magnetite. *A Magn Magn Mat.* 2005; 293(4): 464-72.
12. Sagach VF, Korkach YuP, Kotsuruba AV, Rudyk OV, Vavilova GL. Mitochondrial permeability transition pore opening inhibition by ecdysterone in heart mitochondria of aging rats. *Fiziol Zh.* 2008; 54(4):3–10. [Ukrainian].

13. Cai X, Seal S, McGinnis JF Sustained inhibition of neovascularization in vldlr<sup>-/-</sup> mice following intravitreal injection of cerium oxide nanoparticles and the role of the ASK1-P38/JNK-NF- $\kappa$ B pathway. *Biomaterials*. 2014; 35(1):249-58.
14. Geraets L, Oomen AG, Schroeter JD, Coleman VA, Cassee FR. Tissue distribution of inhaled micro- and nano-sized cerium oxide particles in rats: results from a 28-day exposure study. *Toxicol Sci*. 2012; 127(2):463-73.
15. Ciofani G, Genchi GG, Mazzolai B, Mattoli V. Transcriptional profile of genes involved in oxidative stress and antioxidant defense in PC12 cells following treatment with cerium oxide nanoparticles. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1840(1):495-506.
16. Cheng G, Guo W, Han L, Chen E, Kong L, Wang L, et al. Cerium oxide nanoparticles induce cytotoxicity in human hepatoma SMMC-7721 cells via oxidative stress and the activation of MAPK signaling pathways. *Toxicol In Vitro*. 2013; 27(3): 1082-88.
17. Terskov IA, Gittelzon II. Method chimicheskikh (kislotnich) erythrogram. *Biophysika*. 1957; 2(2) :259-66. [Russian].
18. Zavodnjuk I, Piletskaja TP. Kislotnij lisis erythrocytov cheloveka. *Biophysika*. 1997; 42(5) : 106-12. [Russian].
19. Anderson DR, Davis JL, Carraway KL. Calcium-promoted changes of the human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem*. 1977; 252(19): 6617-23.
20. Petrov V, Lijnen P. Regulation of human erythrocyte Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange by soluble and particulate guanylat cyclase. *Am. J. Physiol*. 1996; 271(8):C1556-64.
21. Iukacs GL, Kapus A, Nanda A. Proton conductance of the plasma membrane: properties, regulation and functional role. *Am. J. Physiol*. 1993; 265(1) :C3-14.

*Матеріал надійшов до редакції 30.09.2014*