

Фокальна ішемія-реперфузія головного мозку викликає зниження стійкості до кислотного гемолізу еритроцитів венозної крові, яке запобігається дією екдистерону

А.В. Коцюруба, Р.Р. Шаріпов, Б.С.Коп'як, В.Ф. Сагач

Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ; e-mail: toliko49@ukr.net

*Дослідили стійкість до кислотного гемолізу еритроцитів відтікаючої від головного мозку крові в динаміці фокальної ішемії (на 15, 30, 45 і 60-й хвилині) та в ранній (5хв) і віддадений (24год) період реперфузії у дорослих щурів, які з профілактичною метою протягом 18 діб отримували per os по 1 мг/кг екдистерону у вигляді стандартизованого екстракту рослини *Serratula coronata*. Проведений аналіз кінетичних кривих кислотного гемолізу показав значне (майже у 60 разів, від 1,45 до 85,85 % на 60-й хвилині ішемії і 5-й хвилині реперфузії відповідно) зростання частки еритроцитів з низькою стійкістю до кислотного гемолізу у контрольних щурів, які не отримували екдистерон. В еритроцитах тварин, протектованих екдистероном, таких значних змін не відбувалося, що свідчить про значне підвищення стійкості еритроцитів до кислотного гемолізу за його профілактичного введення. Суттєве зниження підвищених, особливо в ранній період реперфузії, пулів дієвих кон'югатів і лейкотрієну C_4 вказує на можливий антирадикальний механізм протекторної дії екдистерону.*

Ключові слова: фокальна ішемія-реперфузія головного мозку; еритроцити венозної крові головного мозку; кислотний гемоліз; щури; екдистерон.

ВСТУП

Нещодавно [1,2] ми показали, що за цереброкордіального синдрому, викликаного експериментальною фокальною ішемією-реперфузією головного мозку, значна частина (40 %) тварин гинули внаслідок розвитку в мітохондріях серця як оксидативного, так і нітрозативного стресу. Причиною оксидативного стресу є значне підвищення генерації супероксиду, а нітрозативного – поява в клітинах надлишкового оксиду азоту (NO) внаслідок активації його індукційного синтезу або, додатково, ще й за рахунок декомпозиції нітрозотіолів. За наявності підвищених рівнів генерації супероксиду або NO утворюється токсичний пероксинітрит, потужний окисник і відкривач мітохондріальної пори (МП) пере-

© А.В. Коцюруба, Р.Р. Шаріпов, Б.С.Коп'як, В.Ф. Сагач

мінної проникності, а, тим самим, і ініціатор апоптозу. В мітохондріях серця дорослих щурів показано інгібування екдистероном оксидативного [1] і нітрозативного [2] стресу за фокальної ішемії-реперфузії головного мозку і за експериментального цукрового діабету 1-го типу [3,4], а також пригнічення кальцій- і радикаліндукованого відкриття пори у мітохондріях серця старих щурів [5].

Метою цієї роботи було дослідження стійкості до кислотного гемолізу еритроцитів венозної крові головного мозку за його фокальної ішемії-реперфузії і можливу протекцію цього процесу екдистероном.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили на трьох групах щурів (по 10 у кожній) лінії Вістар масою

280-320 г, згідно з вимогами Європейської конвенції із захисту хребетних тварин (Страсбург, 1986). Першу групу склали інтактні тварини, у яких визначали лише вихідні показники кислотного гемолізу (0-ва точка до початку ішемії). До другої контрольної групи входили тварини, яким моделювали фокальну ішемію-реперфузію головного мозку оклюзією середньої мозкової артерії [1]. До третьої групи входили щури, які отримували екдистерон протягом 18 діб по 1 мг/кг за добу з питною водою у вигляді стандартизованого екстракту рослини *Serratula coronata* (препарат «Біоспон» виробництва Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України), після чого їм моделювали фокальну ішемію-реперфузію головного мозку у тварин другої і третьої груп із яремної вени в динаміці ішемії (через 15, 30, 45 і 60 хв), а також через 5 хв і 24 год реперфузії відбирали по 0,1 мл відтікаючої від головного мозку крові для визначення пулів дієвних кон'югатів (ДК) і лейкотрієну C₄ (LTC₄) [1] та проведення кислотного гемолізу [6,7]. Кислотний гемоліз еритроцитів здійснювали за методом Терскова і Гіттельзона, який нами недавно детально описаний [7]. Вміст загального білка у крові визначали за методом Лоурі [8]. Отримані результати

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

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Отримані результати (рис.1,2) свідчать про зростання стійкості до кислотного гемолізу (зменшення проникності для протонів плазматичної мембрани еритроцитів) відтікаючої від головного мозку венозної крові в період ішемії і, навпаки, істотне її зниження (збільшення проникності для протонів) у ранній період реперфузії головного мозку. Екдистерон інгібував надмірну стійкість до кислотного гемолізу в період ішемії і, навпаки, значно збільшував її в ранній період реперфузії. Слід відмітити, що на 60-й хвилині ішемії у еритроцитів венозної крові із головного мозку контрольної групи тварин другої групи в 4,6 раза зростала тривалість кислотного гемолізу (див. рис.1,а) і на 70 % – інтегральний індекс (див. рис.1,б), який кількісно оцінює стійкість до гемолізу всієї популяції еритроцитів крові [7]. У еритроцитів тварин третьої групи, які отримували екдистерон, тривалість кислотного гемолі-

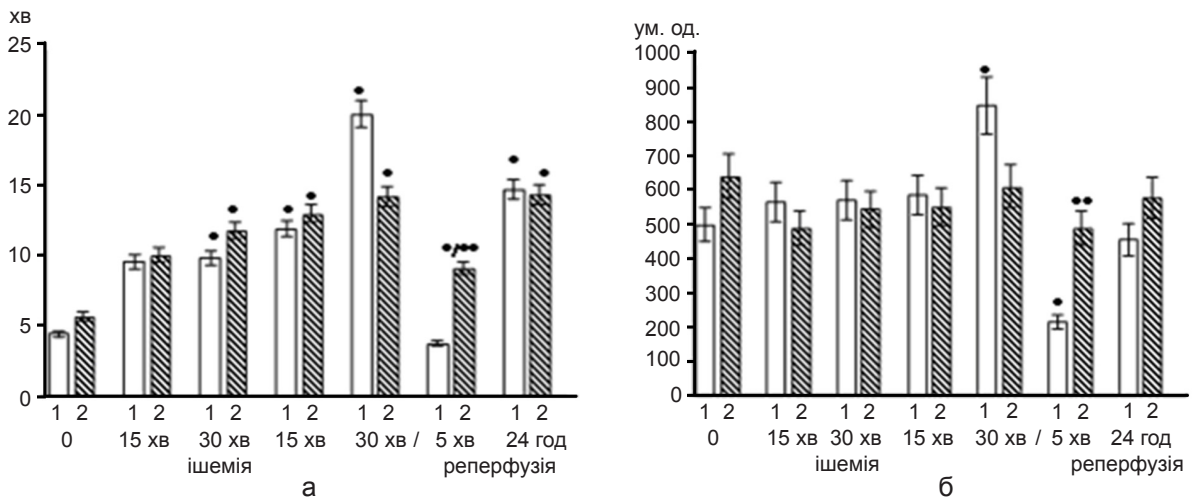


Рис.1. Зміни тривалості кислотного гемолізу (а) і інтегрального індексу стійкості еритроцитів (б) венозної крові із головного мозку за його фокальної ішемії-реперфузії у контролі (1) і за протекторної дії екдистерону (2).

* P<0,05 різниця вірогідна відносно значення до ішемії (0 хв); ** P<0,05 різниця вірогідна відносно значення у контрольних щури

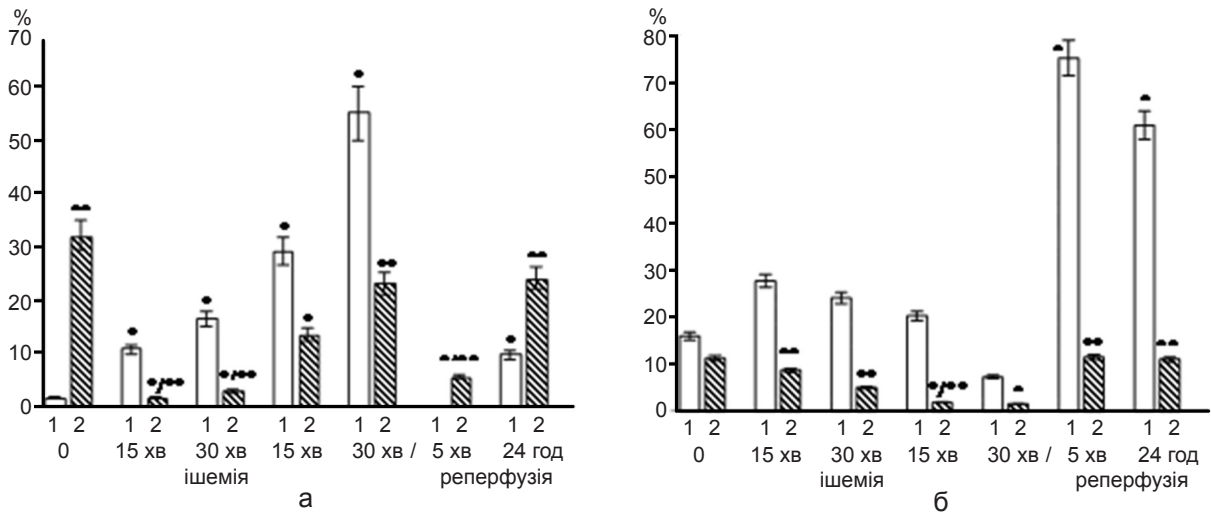


Рис. 2. Зміни частки стійких (а) і нестійких (б) до кислотного гемолізу еритроцитів венозної крові із головного мозку щурів за його фокальної ішемії-реперфузії у контролі (1) і за протекторної дії екдистерону (2).

* $P < 0,05$ різниця вірогідна відносно значення у інтактних тварин (0 хв); ** $P < 0,05$ різниця вірогідна відносно значення у контрольних щурів

зу зростала лише у 2,5 раза (див. рис.1,а), а індекс стійкості в період ішемії не змінювався (див. рис.1,б). На 5-й хвилині реперфузії ці показники в контрольній групі тварин знижувались у 4-5 разів, тоді як у протектованих екдистероном вони були вірогідно вищими від контрольних значень. Уже через 24 год реперфузії тривалість кислотного гемолізу еритроцитів в обох групах тварин зрівнялася і була в декілька разів вищою від вихідних (до ішемії) значень.

На рис.2 показано зміни частки нестійких (гемолізуються менш ніж за 2,5 хв) і стійких (гемолізуються більш ніж за 7,5 хв) до кислотного гемолізу еритроцитів у загальній їх кількості в динаміці (0-60 хв) ішемії і реперфузії (5 хв і 24 год) контрольних і протектованих екдистероном щурів. У контрольних тварин відсоток нестійких до гемолізу еритроцитів венозної крові вірогідно не змінювався у ішемічний період, тоді як в період реперфузії він зростав. Особливо значним було підвищення на 5-й хвилині реперфузії (майже у 60 разів, від 1,4 % на 60-й хвилині ішемії до 85,8 %). У тварин, що отримували екдистерон, частка нестійких до гемолізу еритроцитів була нижчою від контрольних

значень на всьому дослідженому інтервалі ішемії-реперфузії і зростала на 5-й хв реперфузії лише у 8 разів (від 0,3 % на кінець ішемії до 2,3 %, див. рис. 2,б). У проміжку від 30-ї до 60-ї хвилини ішемії частка стійких до кислотного гемолізу еритроцитів зростала як у контрольних, так і у протектованих екдистероном щурів. Цей показник у протектованих тварин був нижчим контрольного рівня на всіх досліджених інтервалах ішемічного періоду. Так, на 60-й хвилині частка стійких до гемолізу еритроцитів у контрольних тварин становила 87,6 %, що у 6 разів більше від вихідного значення, тоді як у дослідних щурів, що профілактично отримували екдистерон, вона була всього 23,1 %, що майже у 4 рази менше від контрольного значення. Крім того, якщо на 5-й хвилині реперфузії у еритроцитах контрольних тварин спостерігалось значне (від 87,6 до 0 %) зниження частки стійких до кислотного гемолізу клітин, то за дії екдистерону вона знижувалась значно меншою мірою («всього» у 4 рази, від 23,1 до 5,5 %).

Таким чином, представлені на рис.1 і 2 результати показують, що за ішемії-реперфузії головного мозку у еритроцитах відтіка-

ючої від нього венозної крові відбуваються реципрокні зміни проникності плазматичної мембрани для протонів – значне прогресуюче зниження в період ішемії і, навпаки, істотне зростання в ранній період реперфузії. Фармакологічне preconditioning протягом 18 діб за допомогою екдистерону, що є природним аналогом кальцій- і апоптозрегулюючого гормону кальцитриолу, запобігає кислотному гемолізу еритроцитів за експериментальної фокальної ішемії-реперфузії головного мозку.

Раніше ми показали, що екдистерон, завдяки інгібуванню оксидативного і, особливо, нітрозативного стресу [1–4], як і Ca^{2+} , та радикалзалежного відкриття МП, унеможливував ініціювання програми некрозу кардіоміоцитів у старих щурів [5]. Стійкість еритроцитів до кислотного гемолізу (однією із форм некротичної смерті цих клітин) залежить від проникності їх плазматичної мембрани для протонів, що визначається спряженим (coupling) чи неспряженим (uncoupling) станом Ca^{2+} -АТФази плазматичної мембрани цих клітин, яка здійснює обмін одного H^+ („входить” в еритроцит) на Ca^{2+} („виходить” із еритроцита) [9–15]. Можна припустити, що в умовах зростання вмісту дезоксигемоглобіну в еритроцитах відтікаючої від головного мозку венозної крові за його ішемії посилюється реутилізаційний синтез NO відновленням нітрит-аніона [16,17], що і зумовлює підвищення їх стійкості до кислотного гемолізу внаслідок неспряження Ca^{2+} -АТФази і інгібування „входу” H^+ в еритроцити (див. рис.1).

Наразі ми показали значне зростання проникності плазматичної мембрани еритроцитів для H^+ в ранній період реперфузії головного мозку і інгібування цього процесу екдистероном (див. рис.1,2). У ранній період реперфузії, коли потужний реутилізаційний синтез NO відновленням нітрит-аніона дезоксигемоглобіном різко знижується внаслідок превалювання окси-форми гемоглобіну, Ca^{2+} -АТФаза може переходити у спряжену форму внаслідок чого зростає вхід H^+ в еритроцити

і скорочується тривалість їх кислотного гемолізу, на що вказує як зниження інтегрального індексу стійкості (див. рис.1,б) і, особливо, частки нестійких до кислотного гемолізу еритроцитів венозної крові, які гемолізуються менше ніж за 2,5 хв (див. рис.2,б). Антигемолітична дія екдистерону в цих умовах може зумовлюватися як впливом на синтез NO в еритроцитах, на що вказують наші попередні праці [3–5], так і інших чинників, що регулюють кальцій-протонний обмін в еритроцитах. Механізмом такої регуляції може бути окисна модифікація ліпідного оточення Ca^{2+} -АТФази в плазматичній мембрані внаслідок інтенсифікації вільнорадикального процесу перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). Із рис. 3 видно, що вміст ДК, які є маркером інтенсивності ПОЛ, у венозній крові зростає з різною інтенсивністю як в ішемічний, так і в реперфузійний, особливо його ранній період, і значно пригнічується дією екдистерону. Також не виключена регуляторна роль у процесі транспорту H^+ в еритроцити LTC_4 , який в них не лише інтенсивно синтезується, але і має специфічний рецептор $CysLT1$ на плазматичній мембрані [18]. Ми показали (див. рис.4) значне зростання у крові яремної вени вмісту LTC_4 як протягом усього ішемічного періоду, так і в ранній та віддалений

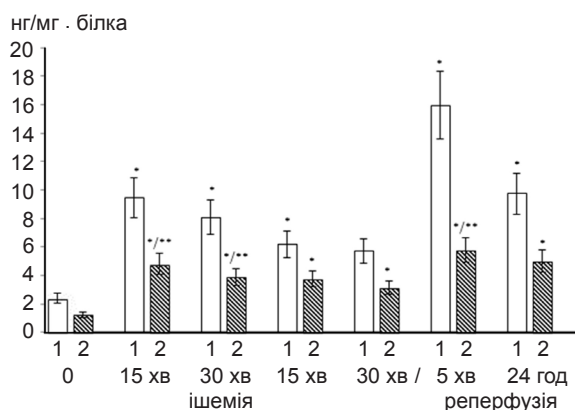


Рис.3. Зміни вмісту дієнових кон'югатів у венозній крові із головного мозку за його фокальної ішемії-реперфузії у контролі (1) і за протекторної дії екдистерону (2).

* $P < 0,05$ різниця вірогідна відносно значення у інтактних тварин (0 хв); ** $P < 0,05$ різниця вірогідна відносно значення у контрольних щурів

реперфузійний період. Екдистерон інгібував його підвищення у венозній крові головного мозку за його ішемії-реперфузії, тим самим зберігаючи необхідний для синтезу LTC₄ глутатіон. Останній має велике значення для захисту органів від пошкодження за ішемії-реперфузії [19], в т.ч., регулюючи спряження конститутивних NO-синтаз.

Отже, проведені дослідження показали значне підвищення проникності для протонів плазматичної мембрани еритроцитів із яремної вени в ранній період (5хв) реперфузії головного мозку після 60 хв ішемії, та значне інгібування цього процесу екдистероном. Така протекторна щодо еритроцитів дія екдистерону мала за наслідок, як показано нами раніше [1,2], 100% виживання тварин після 24 год реперфузії головного мозку (в непротектованому контролі вижило лише 60% тварин), а також значні позитивні зміни відносного вмісту еритроцитів із різною стійкістю до кислотного гемолізу. Протекторна дія екдистерону може зумовлюватися інгібуванням Ca²⁺-АТФази, яка знаходиться під контролем протеїнкінази С [10]. Таким чином, активні форми кисню і азоту, котрі можуть регулювати як стан окиснення тіолових груп, так і ліпідного оточення в плазматичній мембрані Ca²⁺-АТФази та протеїнкінази С [14], повинні

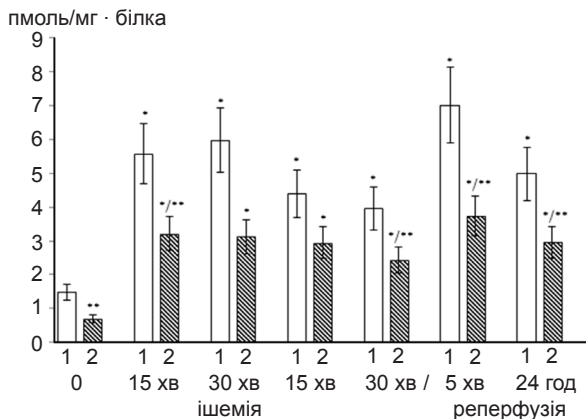


Рис. 4. Зміни вмісту пептидолейкотриєну С4 у венозній крові із головного мозку за його фокальної ішемії-реперфузії у контролі (1) і за протекторної дії екдистерону (2). * P<0,05 різниця вірогідна відносно значення у інтактних тварин (0 хв); ** P<0,05 різниця вірогідна відносно значення у контрольних шурів

займати важливе місце в ієрархії регуляторів кислотної резистентності еритроцитів.

Загальний вміст кальцію в еритроцитах варіює між 5 і 15нмоль/мл клітин і цей низький рівень частково зумовлений відсутністю в цих клітинах Ca²⁺-вмісних органел – мітохондрій, ендоплазматичного ретикулула і ядра [20]. Основна частина цитозольного Ca²⁺ знаходиться у зв'язаному стані, а низький вміст іонізованого Ca²⁺ (близько 0,2 мкмоль/л) можуть зростати у 3-7 разів за фізіологічних умов внаслідок підвищення зазвичай низької проникності плазматичної мембрани і активності Ca²⁺-помпи - (Ca²⁺, Mg²⁺)-стимульованої АТФази [20]. За патофізіологічних умов саме значне підвищення концентрації вільного іонізованого Ca²⁺ в цитозолі клітин, в т.ч. і еритроцитів, служить тригером багатьох процесів, що пошкоджують клітини і навіть можуть викликати їх загибель. Відносно еритроцитів остання буває некротичною (за допомогою різного роду гемолізів) або апоптичною (за допомогою ериптозу). У всіх клітинах, в т.ч. і в еритроцитах, і апоптична, і некротична програми загибелі ініціюється підвищеними концентраціями Ca²⁺ в цитозолі. Це підтверджує виключну роль в їх реалізації вищевказаного механізму проникнення Н⁺ в цитозоль еритроцитів через Ca²⁺- Н⁺ обмін, який здійснюється Ca²⁺-АТФазою у спряженому стані. Подібний механізм діє також в гладеньких м'язах судин [21]. Унікальність еритроцитів полягає в тому, що для них саме Ca²⁺ - Н⁺ обмін, за відсутності клітинних депо кальцію, є чи не єдиним запобіжним від апоптозу/некрозу способом. На наш погляд, за фокальної ішемії-реперфузії головного мозку спостерігається така послідовність процесів у еритроцитах його венозної крові: певне підвищення концентрації Ca²⁺ в цитозолі еритроцитів для запобігання (як адаптивний процес) її подальшого підвищення «включає» Ca²⁺- Н⁺ обмін за якого Ca²⁺ «викидається» в плазму, що підвищує в ній їх концентацію, але недостатню для

інгібування подальшого його «виходу» із еритроцитів. Внаслідок цього із плазми протони, концентрація яких, що давно відомо, за ішемії підвищується «заходять» в еритроцити. Тепер уже, щоб зменшити внутрішньоклітинну концентрацію протонів (запобігти зниженню рН в еритроцитах), активуються процеси їх «евакуації» в плазму. Існує давно відомий процес видалення H^+ через аніонний канал у вигляді іонів бікарбонату (HCO_3^-), а також, як було встановлено зовсім недавно, і іонів гідросульфиду (HS^-) [22]. Обидва аніони інтенсивно і постійно синтезуються в еритроцитах, останній ферментом 3-меркаптопіруватсульфотрансферазою (3-MPST), наявним також і в мітохондріях клітин різних органів серцево-судинної системи. Згідно з нашою гіпотезою, саме адаптивне запобігання реалізації менш шкідливої для організму апоптичної загибелі еритроцитів призводить до реалізації більш шкідливої для всіх клітин організму, але лише частково для еритроцитів, некротичної їх загибелі за гемолізу. Річ у тому, що руйнування плазматичної мембрани еритроцитів за гемолізу, в т.ч. кислотного, призводить не лише до виділення в плазму токсичних сполук (у першу чергу, вільного гемоглобіну, що є скавенджером оксиду азоту), але і до виділення аденозинтрифосфату і газових трансмітерів оксиду вуглецю (СО) [23] і сірководню [24]. Як давно відомо, СО виділяється внаслідок розщеплення гему стресовим ферментом гемоксидазою. При цьому утворюється також потужний антиоксидант білірубін, протекторна роль якого явно недооцінена [25]. Отже, помірний кислотний гемоліз еритроцитів може бути процесом, що забезпечує організм біорегуляторами.

Важливу роль визначення саме кислотного гемолізу еритроцитів набуває через можливість опосередкованої швидкої (скрінінгової) оцінки дії різних лікарських засобів, в т.ч. антигіпертензивних, на зміни цитозольного кальцію, спряжений/неспрямований стан Ca^{2+} -АТФази і активність кальцій-протонного обміну та протеїнкінази С в еритроцитах, а

відтак і в інших клітинах, позаяк еритроцити давно визнані універсальним маркером проникності плазматичних мембран для різних іонів.

ВИСНОВКИ

1. В період фокальної ішемії головного мозку стійкість до кислотного гемолізу еритроцитів його венозної крові у контрольних щурів зростає, тоді як в ранній період реперфузії (5 хв), навпаки, надмірно (майже в 60 разів) знижується порівняно з такою на 60-й хвилині ішемії.

2. У протектованих екдистероном тварин стійкість еритроцитів венозної крові із головного мозку до кислотного гемолізу на 5-й хвилині його реперфузії порівняно із рівнем на 60-й хвилині ішемії знижувалася значно меншою мірою (лише у 8 разів).

3. Протягом всього періоду ішемії-реперфузії головного мозку у його венозній крові контрольних тварин пули як дієвих кон'югатів, так і пептидолейкотрієна C_4 були значно вищими, ніж у протектованих екдистероном щурів, що передбачає можливий антирадикальний механізм захисної дії екдистерону.

А.В. Коцюрба, Р.Р. Шарипов, Б.С. Копьяк, В.Ф. Сагач

ФОКАЛЬНАЯ ИШЕМИЯ-РЕПЕРФУЗИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА ВЫЗЫВАЕТ СНИЖЕНИЕ СТОЙКОСТИ К КИСЛОТНОМУ ГЕМОЛИЗУ ЭРИТРОЦИТОВ ЕГО ВЕНОЗНОЙ КРОВИ, КОТОРОЕ ПРЕДОТВРАЩАЕТСЯ ДЕЙСТВИЕМ ЭКДИСТЕРОНА

Определили стойкость к кислотному гемолизу эритроцитов венозной крови из головного мозга в динамике ишемического периода (на 15, 30, 45 и 60-й минуте), а также в ранний (5 мин) и отдаленный (24 ч) период реперфузии у взрослых крыс, которые с профилактической целью в течение 18 сут получали *per os* по 1 мг/кг экдистерона в виде стандартизированного экстракта *Serratula coronata*. Проведенный анализ кинетических кривых кислотного гемолиза показал значительное (почти в 60 раз, от 1,45 до 85,85 %, на 60-й минуте ишемии и 5-й минуте реперфузии

соответственно) увеличение доли нестойких к кислотному гемолизу эритроцитов. Препаративное экдистероном значительно увеличивало стойкость к кислотному гемолизу эритроцитов венозной крови из головного мозга. В ранний период реперфузии доля лабильных клеток у этих животных возрастала лишь в 8 раз (от 0,29 до 2,29 %, на 60-й мин ишемии и 5-й минуте реперфузии соответственно). На протяжении всего периода ишемии, с максимумом на 15-й минуте, в венозной крови из головного мозга в 4 раза увеличивались пулы диеновых конъюгатов (от 2,40 до 9,48 нг/мг белка) и пептидолейкотриена C₄ (от 1,49 до 5,98 пмоль/мг белка). Ещё больше пулы диеновых конъюгатов и лейкотриена C₄ возрастали на 5-й минуте реперфузии. При этом, как в период ишемии, так и в ранний период реперфузии у протектированных экдистероном животных таких значительных изменений не наблюдали. Последнее предполагает возможный антирадикальный механизм антигемолитического действия экдистерона в ранний период реперфузии.

Ключевые слова: фокальная ишемия-реперфузия головного мозга; эритроциты венозной крови из головного мозга; кислотный гемолиз; крысы; экдистерон.

A.V. Kotsuruba, R.R. Sharipov, B.S. Kopyak, V.F. Sagach

BRAIN FOCAL ISCHEMIA-REPERFUSION CAUSES A DECREASED RESISTANCE OF ERYTHROCYTES FROM VENOUS BLOOD TO ACID HEMOLYSIS, WHICH IS PREVENTED BY ECDYSTERONE

We investigated the resistance of erythrocytes from rat brain venous blood to acid hemolysis in the dynamics of brain ischemic period (15, 30, 45 and 60 min), as well as in the early (5 min) and distant (24h) period of brain reperfusion. Brain ischemia-reperfusion was made in rats that received ecdysterone (standartized extract of *Serratula coronata*) within 18 days (per os, 1 mg/kg). Analysis of the kinetic curves of acid hemolysis showed a pronounced (60 times, from 1.45 to 85.85 % at 60 min of brain ischemia and at 5 min of brain reperfusion, respectively) increase of unstable erythrocytes that hemolyzed easily (<2.5 min). In the preconditioned rats, this increase was only 8- fold. During the period of brain ischemia, with a maximum at 15th minute, in the venous blood from brain the diene conjugates (DK) pools increased from 2.40 to 9.48 ng/mg protein and LTC₄ pools increased from 1.49 to 5.98 pmol/mg protein. Even more pools of DC and LTC₄ were increased at 5th min of brain reperfusion. In animals received ecdysterone, during ischemia and early reperfusion period, both pools of DC and LTC₄ in venous blood were lower than that in the controls. The latter implies a possible antiradical mechanism of the protective effect of ecdysterone.

Key words: erythrocytes; brain focal ischemia-reperfusion; venous blood from brain; acid hemolysis; rats; ecdysterone.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv.

REFERENSES

1. Sharipov RR, Kotsiuruba AV, Kop'яk BS, Sahach VF. Induction of oxidative stress in heart mitochondria in brain focal ischemia-reperfusion and protective effect of ecdysterone. *Fiziol Zh.* 2014; 60(3):11-7. [Ukrainian].
2. Sharipov RR, Kotsiuruba AV, Kop'яk BS, Sahach VF. Induction of nitrosative stress in mitochondria of rats hearts in experimental ischemia-reperfusion of the brain and its correction by ecdysterone. *Fiziol Zh.* 2014; 60(5):3-13. [Ukrainian].
3. Korkach JuP, Rudyk OV, Kotsuruba AV, Prysyazhna OD, Sagach VF. The nitric oxide and superoxide syntesis in protective action of ecdysterone in mitochondrias of rat's hearts with streptozotocin-induced diabetes. *Fiziol Zh.* 2007; 53(5):22-8. [Ukrainian].
4. Sagach VF, Korkach YuP, Kotsuruba AV, Prysyazhna OD. The inhibition of oxidative and nitrosative stresses by ecdysterone as the mechanisms of its cardio- and vasoprotective action at type I diabetes. *Fiziol Zh.* 2008; 54(5):46-54. [Ukrainian].
5. 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].
6. Terskov IA, Gittelzon II. Method chimicheskikh (kislotnich) erythrogram. *Biophysika.* 1957; 2(2):259-66. [Russian].
7. Kotsuruba AV, Kop'яk BS, Sahach VF, Spivak NJa. Old rats erythrocytes stability to acid hemolysis restoring by cerium oxide nanoparticles. *Physiol. Zh.* 2014; 60(6): 3-9. [Ukrainian].
8. Lowery OH, Rosebrough NI, Farr AL, Randall RI. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1): 265-75.
9. Wright LC, Chen S, Roufogalis BD. Regulation of the activity and phosphorylation of the plasma membrane Ca(2+)-ATPase by adriamycin in intact human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys.* 1995; 321(2):459-66.
10. de Jong K, Rettig MP, Low PS, Kuypers FA. Protein kinase C activation induces phosphatidylserine exposure on red blood cells. *Biochemistry.* 2002; 41(41):12562-7.
11. Milanick MA. Proton fluxes associated with the Ca pump in human red blood cells. *Am J Physiol.* 1990; 258(3 Pt 1):C552-62.
12. Gassner B, Luterbacher S, Schatzmann HJ, Wüthrich A. Dependence of the red blood cell calcium pump on the membrane potential. *Cell Calcium.* 1988; 9(2):95-103.
13. Xu W, Wilson BJ, Huang L, Parkinson EL, Hill BJ, Milanick MA. Probing the extracellular release site of the plasma membrane calcium pump. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000; 278(5):C965-72.
14. Hebbel RP, Shalev O, Foker W, Rank BH. Inhibition of erythrocyte Ca²⁺-ATPase by activated oxygen through thiol- and lipid-dependent mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 1986; 862(1):8-16.
15. Bisognano JD, Dix JA, Pratap PR, Novak TS, Freedman JC. Proton (or hydroxide) fluxes and the biphasic osmotic

- response of human red blood cells. *J Gen Physiol.* 1993; 102(1): 99-123.
16. Gladwin MT, Kim-Shapiro DB. The functional nitrite reductase activity of the heme-globins. *Blood.* 2008; 112(7):2636-47.
17. Crawford JH, Isbell TS, Huang Z, Shiva S, Chacko BK, et al. Hypoxia, red blood cells, and nitrite regulate NO-dependent hypoxic vasodilation. *Blood.* 2006; 107(2):566-74.
18. Foller M, Mahmud H, Gu S, Wang K, Floride E, Kucherenko Y, Luik S, Laufer S, Lang F. Participation of leukotriene C(4) in the regulation of suicidal erythrocyte death. *J Physiol Pharmacol.* 2009; 60(3):135-43.
19. van Asbeck BS, Hoidal J, Vercellotti GM, Schwartz BA, Moldow CF, Jacob HS. Protection against lethal hyperoxia by tracheal insufflation of erythrocytes: role of red cell glutathione. *Science.* 1985; 227(4688):756-9.
20. Wiley JS, McCulloch KE. Calcium ions, drug action and the red cell membrane. *Pharmacol Ther.* 1982; 18(2):271-92.
21. Daugirdas JT, Arrieta J, Ye M, G Flores G, Battle DC. Intracellular acidification associated with changes in free cytosolic calcium. Evidence for Ca²⁺/H⁺ exchange via a plasma membrane Ca(2+)-ATPase in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1995; 95(4):1480-9.
22. Jennings ML. Transport of H₂S and HS(-) across the human red blood cell membrane: rapid H₂S diffusion and AE1-mediated Cl(-)/HS(-) exchange. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2013; 305(9):C941-50.
23. Wu I, Wang R. Carbon Monoxide: Endogenous Production, Physiological Functions, and Pharmacological Applications. *Pharmacol. Rev.* 2005; 57(4):585-630.
24. Leffler CW, Parfenova H, Jaggar JH, Wang R. Carbon monoxide and hydrogen sulfide: gaseous messengers in cerebrovascular circulation. *J Appl Physiol.* 2006; 100(3):1065-76.
25. Sedlak W, Saleh M, Higginson DS, Paul BD, Juluri KR, Snyder SH. Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. *PNAS.* 2009; 106(13): 5171-6.

*Матеріал надійшов
до редакції 24.03.2015*