УДК 612.118.221.3.014.43

Н.В.Орлова, Н.М.Шпакова

Механізм захисної дії амфіфільних сполук в умовах гіпертонічного гемолізу еритроцитів

Были исследованы особенности проявления антигемолитического эффекта представителей различных классов амфифильных соединений в условиях гипертонического гемолиза эритроцитов при различной температуре (0 и 37 °С) и обработке клеток диамидом. Установлено, что уровень максимальной антигемолитической активности и значения эффективных концентраций всех исследуемых веществ ниже при 0 °С, чем при 37 °С. Обработка эритроцитов диамидом (5 и 10 ммоль/л) не изменяет чувствительности клеток к гипертонической среде. Показано температурозависимое снижение эффективности исследуемых веществ при гипертоническом гемолизе эритроцитов, обработанных 10 ммоль/л диамидом. Выявленное снижение эффективности амфифилов под влиянием низкой температуры и диамида в высокой концентрации обусловлено, по-видимому, однонаправленным изменением структурно-динамического состояния эритроцитарной мембраны под их влиянием.

ВСТУП

У кров'яному руслі еритроцити існують у досить вузьких межах зміни осмотичності, температури, pH тощо. Перенесення еритроцитів у нефізіологічні умови дозволяє вивчати адаптаційні можливості клітин. Так, еритроцити людини зберігають бар'єрні властивості стосовно внутрішньоклітинних іонів калію у діапазоні концентрації NaCl від 0,075 до 0,75 моль/л [2, 16], а при досягненні концентрації 2,7 моль/л спостерігається вихід гемоглобіну з клітин [4]. Літературні дані свідчать, що зміна вихідного стану клітин може призводити до розширення адаптаційних можливостей і підвищення їхньої стійкості до різкої зміни осмотичних умов середовища [6, 7]. Наприклад, попередня часткова дегідратація еритроцитів (у 0,45 моль/л NaCl) дає змогу істотно підвищити стійкість клітин до дії висококонцентрованих розчинів солей [7]. Насичення клітин глюкозою також сприяє підвищенню їхньої стійкості до гіпертонічного стресу [6].

Хагерстренд із співавт. [18] встановили, що амфіфільні речовини, які досить різноманітні за хімічною будовою, знижують рівень гіпотонічного пошкодження еритроцитів. Водночас вони здатні виявляти антигемолітичну активність і в гіпертонічному середовищі [13]. Вважають, що дія амфіфілів реалізується, у першу чергу, на рівні мембрани [18]. Отже, прояв їх антигемолітичного ефекту буде визначатися структурно-динамічним станом еритроцитарної мембрани.

Мета нашої роботи – дослідження особливостей антигемолітичного ефекту представників різних класів амфіфільних сполук за умов гіпертонічного гемолізу еритроцитів при різній температурі й обробці клітин діамідом.

МЕТОДИКА

У роботі було використано хлорпромазин гідрохлорид (ХД), додецил-β,D-мальтозид (ДМ), 3-цетилдиметиламоній-1-пропансульфонат натрію (ЦП; "Calbiochem") і додецилсульфат натрію (ДС; "Синтезпав").

© Н.В.Орлова, Н.М.Шпакова

Еритроцити одержували з крові (II група) донорів-чоловіків за загальноприйнятою методикою [13]. Гіпертонічному стресу еритроцити піддавали перенесенням їх на 5 хв у розчин, що містить 4,0 моль/л NaCl (гематокрит 0,4 %), при 37 і 0 °С. Амфіфільну сполуку додавали в гіпертонічне середовище перед внесенням клітин. Вміст гемоглобіну в супернатанті визначали спектрофотометрично (λ=543 нм). Значення максимальної антигемолітичної активності (АГ) амфіфільної сполуки розраховували за формулою:

$$АГ = \frac{к - а}{к} \times 100\,\%,$$

де к – величина гемолізу еритроцитів у відсутності амфіфільної речовини;
а – мінімальна величина гемолізу еритроцитів при наявності амфіфільної речовини.

Еритроцити обробляли діамідом [17], після чого відмиті від модифікатора клітини піддавали гіпертонічному стресу в середовищі, що містить 4,0 моль/л NaCl. Вихід іонів калію з еритроцитів визначали методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії [8].

РЕЗУЛЬТАТИ

Різкі зміни умов позаклітинного середовища часто призводять до порушення структурно-функціонального стану еритроцитів. Так, зміна осмолярності середовища може супроводжуватися порушенням бар'єрних властивостей еритроцитарних мембран для іонів і, врешті-решт, для молекул гемоглобіну. Амфіфіли з чітко вираженими гідрофобною та гідрофільною частинами здатні виявляти антигемолітичну активність в умовах осмотичного стресу еритроцитів [18].

Відповідно до сучасної класифікації, основаної на фізико-хімічних властивостях молекул, амфіфільні речовини поділяють на катіонні, аніонні, цвітер-іонні та неіонні. У роботі були використані представники зазначених класів речовин. Неіонні амфіфіли представлені ДМ, катіонні – ХП, похідним фенотіазину, аніонні амфіфіли – ДС і цвітер-іонні сполуки – ЦП.

Відомо, що гемоліз еритроцитів у розчині, що містить 4,0 моль/л NaCl, сягає 80–90 % [13]. Усі досліджувані речовини знижують дозозалежно рівень гіпертонічного гемолізу еритроцитів. Діапазони концентрацій досліджуваних амфіфільних сполук були від 0 до 14, 18, 80, 160 мкмоль/л для ЦП, ДМ, ДС і ХП відповідно. З отриманих концентрацій було визначено значення ефективних концентрацій і максимальної антигемолітичної активності (табл. 1). Ефективною концентрацією амфіфільної речовини є середнє арифметичне значення концентрацій даної речовини, що відповідає мінімальному гемолізу еритроцитів. Значення максимальної антигемолітичної активності амфіфільної сполуки є середнє арифметичне значень максимальної антигемолітичної активності даної речовини, які

Таблиця 1. Максимальна антигемолітична активность (АГ) та ефективні концентрації амфіфільних сполук в умовах гіпертонічного стресу еритроцитів у середовищі, що містить 4,0 моль/л NaCl, при 37 та 0 °С (M±m; n=6)

Сполуки	Ефективна концентрація, мкмоль/л		Антигемолітична активність, %	
	37 °С	0 °С	37 °С	0 °С
3-цетилдиметиламоній-1-пропан-сульфонат натрію	8 ±2	1,67 ±0,75*	65 ±4	15 ±1*
Додецилсульфат натрію	6 ±3	3,00 ±0,01*	70 ±6	27 ±3*
Додецил-β,D-мальтозид	21 ±7	6,00 ±0,01*	76 ±7	45 ±3*
Хлорпромазин	124 ±8	20,00 ±0,01*	96 ±2	63 ±6*

*P < 0,05 порівняно з 37 °С

розраховані за вищевказаною формулою.

З табл.1 видно, що амфіфільні сполуки виявляють антигемолітичну активність в умовах гіпертонічного стресу еритроцитів, яка залежить від температури. Для всіх досліджуваних речовин рівень антигемолітичної активності нижче при 0 °С, ніж при 37 °С. Слід зазначити, що при 37 °С максимальну антигемолітичну активність виявляє катіонний ХП, у той час як ефективність інших речовин приблизно однакова. Температура 0 °С дозволяє виявити розходження у дії амфіфільних сполук. Так, речовини в міру зниження антигемолітичної активності можна розташувати в ряд: ХП > ДС > ДМ > ЦП.

Можливо, що зниження ефективності амфіфільних сполук, що спостерігається, зумовлено зміною стану плазматичної мембрани під дією температур, близьких до 0 °С.

Значення ефективних концентрацій амфіфільних сполук при 0 °С нижчі, ніж при 37 °С (див. табл. 1). Якщо для ДМ спостерігається зниження вдвічі, то для ХП – у 6 разів. Амфіфільні молекули переважно вбудовуються в більш рідкі ділянки мембрани [20], тому істотне зниження ефективних концентрацій речовин при 0 °С, очевидно, зумовлено скороченням кількості місць переважного вбудовування в мембрану амфіфільних речовин при низькій температурі.

Діамід – сульфгідрильний реагент, що призводить до перехресних зшивок мембранних білків [17]. Обробка еритроцитів діамідом у концентрації 5 і 10 ммоль/л не впливає на чутливість клітин до гіпертонічного середовища як при 37 °С, так і при 0 °С (табл. 2), однак в умовах інших типів стресу (гіпербаричний вплив [23] і холодовий шок [12]) цей модифікатор здатний знижувати рівень ушкодження клітин.

Щоб оцінити ефективність амфіфільних сполук при гіпертонічному гемолізі еритроцитів, оброблених діамідом, було обрано амфіфільні речовини, ефективність яких в умовах гіпертонічного стресу еритроцитів

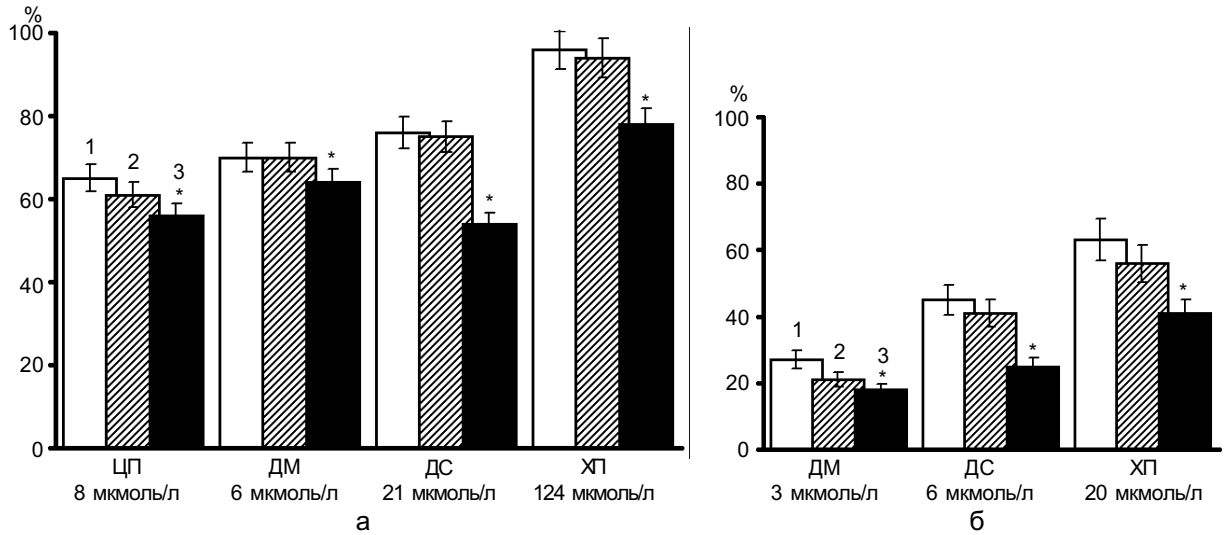
Таблиця 2. Вплив діаміду на рівень гемолізу еритроцитів у середовищі, що містить 4,0 моль/л NaCl, при 37 та 0 °С (M±m; n=6)

Схема досліду	Гемоліз, %	
	37 °С	0 °С
Контроль	79 ±6	80 ±8
Обробка діамідом		
5 ммоль/л	80 ±8	84 ±7
10 ммоль/л	89 ±7	94 ±9

перевищує 20 % (див.табл. 1). Усі сполуки виявляють антигемолітичну активність у цих умовах (рисунок). Антигемолітична активність амфіфільних речовин у разі гіпертонічного стресу еритроцитів, модифікованих 5 ммоль/л діамідом, залишається фактично на рівні контролю, а при обробці 10 ммоль/л спостерігається достовірне зниження ефективності всіх досліджуваних речовин, яке більш виражене для заряджених амфіфілів (ХП, ДС).

Таким чином, низька температура та діамід у високій концентрації (10 ммоль/л) призводять до зниження ефективності амфіфільних сполук. Очевидно, що синергізм температури і модифікатора зумовлений односпрямованою зміною структурно-динамічного стану еритроцитарної мембрани під їхнім впливом.

Досліджувані амфіфільні сполуки виявляють антигемолітичну активність, тобто запобігають виходу гемоглобіну з клітин в умовах стресу. Відомо, що формуванню гемолітичних пор передує порушення іонної проникності еритроцитарних мембран [2]. Тому ми досліджували вплив амфіфільних речовин на проникність мембран еритроцитів для іонів калію. Амфіфіли було використано з ефективними концентраціями для умов гіпертонічного стресу еритроцитів при 37 °С (див.табл. 1). Досліджувані амфіфільні речовини у фізіологічному розчині не порушують бар'єрної функції мембран еритроцитів (табл. 3). Це збігається з раніше отриманими даними про збереження бар'єрної функції мембрани для іонів фериціаніду при наявності ефективної



Прояв антигемолітичної активності (%) амфіфільних сполук в умовах гіпертонічного гемолізу еритроцитів: а – 37 °С, б – 0 °С. 1 – контроль; 2 –5 ммоль/л діаміду; 3 – 10 ммоль/л діаміду. ЦП – 3-цетилдиметиламоній-1-пропансульфонат натрію, ДМ – додецил-β,D-мальтозид, ДС – додецилсульфат натрію, ХП – хлорпромазин гідрохлорид.

P<0,05 порівняно з контролем

концентрації ХП [10]. У гіпертонічному середовищі (4,0 моль/л NaCl) клітини втрачають приблизно 90 % K^+ (при нормуванні на повне руйнування клітин у дистильованій воді з додаванням тритону). У цих умовах амфіфільні сполуки не здатні впливати на порушення проникності мембрани для K^+, які були викликані гіпертонічним середовищем.

Таким чином, у гіпертонічному середовищі амфіфільні речовини запобігають виходу з клітин молекул гемоглобіну, але порушення бар'єрної функції мембрани для іонів калію, внаслідок інкубування у 4,0 моль/л NaCl, зберігається за їх наявності.

ОБГОВОРЕННЯ

Основу лізису еритроцитів при дії різних стресових факторів складають процеси, пов'язані з формуванням і еволюцією мембранних дефектів до розміру гемолітичної пори. Зміна властивостей плазматичної мембрани буде впливати на структурно-динамічний стан мембранної пори. Зниження температури до 0 °С є чинником, який «ущільнює» структуру мембрани; у мембрані відбувається «низькотемпературна усадка ліпідів», при якій молекули зближаються в її латеральній площині [1, 9]. У таких умовах трансмембранна пора, що сформувалася під дією високої тонічності

Таблиця 3 Вплив амфіфільних сполук на проникність мембран еритроцитів для K^+ (M±m; n=6)

Сполуки	Концентрація, мкмоль/л	Вміст калію у середовищах, мг/л	
		0,15 моль/л NaCl	4,0 моль/л NaCl
Контроль	-	0,24 ±0,03	10,97 ±1,06
3-цетилдиметиламоній-1-пропансульфонат натрію	6	0,27 ±0,04	10,99 ±0,93
Додецилсульфат натрію	6	0,21 ±0,02	11,12 ±1,11
Додецил-β,D-мальтозид	20	0,20 ±0,02	10,73 ±0,91
Хлорпромазин	120	0,25 ±0,03	11,05 ±1,10

середовища, характеризується низькою здатністю до замикання.

Порівняльний аналіз антигемолітичної активності амфіфільних сполук в умовах гіпертонічного стресу еритроцитів при температурі 37 і 0 °С показує досить виражену ефективність речовин, однак в останньому випадку захисний ефект менший, що, очевидно, пов'язано зі зміною стану еритроцитарної мембрани при низькій температурі.

Обробка клітин діамідом призводить до модифікації еритроцитарної мембрани. Так, дослідження з використанням конканаваліну А виявили значні зміни поверхні клітин, оброблених діамідом [5]. Крім того, інші автори [11] показали, що модифікація еритроцитів діамідом запобігає злиттю клітин, що індуковане іонами лантану. Діамід на відміну від багатьох інших сульфгідрильних агентів не інгібує водний транспорт [14], може сприяти появі водних пор у мембрані [15]. Показано, що збільшення потоків катіонів з еритроцитів, оброблених діамідом, не є результатом ні стимуляції K^+–Cl^--котранспорту, ні електродифузії [19]. Виявлений ефект зниження деформованості клітин, оброблених діамідом, свідчить про збільшення жорсткості мембрани [22].

Зниження антигемолітичної активності амфіфільних сполук при 37 °С, яке спостерігається в умовах гіпертонічного стресу еритроцитів, що попередньо були оброблені діамідом (див.табл. 2), очевидно, зумовлено формуванням між- і внутрішньобілкових дисульфідних містків, що призводять до збільшення жорсткості еритроцитарної мембрани [11]. Зазначений ефект підсилюється при зниженні температури експерименту до 0 °С (див. рисунок). Можливо, відзначена "жорсткість" еритроцитарної мембрани під дією 0 °С і в результаті обробки клітин діамідом лежить в основі синергізму, що спостерігається. Крім того, низька температура, у свою чергу, може впливати і на деякі фізико-хімічні властивості амфіфільних сполук. Зокрема, значення критичної концентрації міцелоутворення останніх залежить від температури [3], що може змінювати значення літичних концентрацій речовин при її зниженні.

Антигемолітична активність амфіфільних речовин визначається здатністю їхніх молекул вбудовуватися в еритроцитарну мембрану і пертурбувати її. Хагерстренд із співавт. [18] пов'язують захисну дію амфіфілів при гіпотонічному гемолізі еритроцитів з появою у мембрані небішарних фаз. Цимбал і співавт. [10] методом ЕПР-спектрометрії досліджували динамічну структуру еритроцитарної мембрани при наявності катіонної амфіфільної сполуки – ХП у широкому діапазоні концентрацій. Аналіз отриманих даних свідчить про здатність ХП індукувати перебудови динамічної структури мембрани аж до порушення ламелярного упакування фосфоліпідів і появи небішарних структур, особливості яких залежать від концентрації амфіфільної сполуки [10].

Максимальний захисний ефект амфіфілів виявляється тоді, коли вони діють на клітини одночасно зі стресовим фактором [13], тому можна вважати, що їх вплив на мембрану протилежний за спрямованістю тим процесам, які призводять до формування гіпертонічної гемолітичної пори. Гіпертонічні середовища сприяють утворенню дефекту в еритроцитарній мембрані можливо на межі поділу фаз. Очевидно, реорганізація мембрани в результаті вбудовування амфіфільних молекул супроводжується деякою гомогенізацією її компонентів, що перешкоджає або зародженню, або подальшій еволюції дефектів до розміру гемолітичної пори. Ми показали, що амфіфільні речовини у ефективній концентрації „охороняють" клітини від гіпертонічного гемолізу, але не запобігають втраті нею іонів калію (див. табл. 3). Тому можна зробити висновок, що ефект амфі-

філів, у першу чергу, реалізується на етапі зростання мембранного дефекту.

Представлені в цій роботі амфіфільні речовини мають різну будову і відносяться до різних класів. Загальною їх властивістю є амфіфільність, що, певно, складає основу їхньої антигемолітичної дії. З іншого боку, особливості прояву антигемолітичної активності будуть визначатися пертурбуючою активністю речовин, що залежить від фізико-хімічних властивостей їхніх молекул, а також впливу амфіфільних молекул на гідрофобні та електростатичні взаємодії в ліпідному бішарі [21].

N.V.Orlova, N.M. Shpakova

TO THE QUESTION ABOUT MECHANISM OF PROTECTIVE EFFECT OF AMPHIPHILIC COMPOUNDS UNDER HYPERTONIC HEMOLYSIS OF ERYTHROCYTES

Antihemolytic effect of various amphiphilic compounds under conditions of red blood cell hypertonic hemolysis at different temperatures (0 and 37 °C) and cell exposure to diamide was investigated. The level of maximum antihemolytic activity and values of efficient concentrations for all studied substances were lower at 0°C if compared with 37°C. Exposure of erythrocytes to diamide (5 and 10 mmol/l) did not change cell sensibility to hypertonic medium. There has been demonstrated a temperature-dependent decrease in the efficiency of studied substances under hypertonic hemolysis of erythrocytes exposed to 10 mmol/l diamide. Found reduction in efficiency of amphiphiles at low temperature and at high concentration of diamide was probably caused by similar changes of structural and dynamic state of erythrocyte membrane.

Institute of Cryobiology and Cryomedicine, Kharkiv, Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. – К.: Наук. думка, 1994. – 432 с.
2. Бондаренко Т.П. Роль липидов в повреждении мембраны митохондрий и эритроцитов при охлаждении: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1981. – 15 с.
3. Джонс О.Т., Эрнест Ю.П., Мак-Нэми М.Д. Солюбилизация и реконструкция мембранных белков. – В кн.: Биологические мембраны. Методы./Под ред. Дж. Финдлея, У. Эванза. – М.: Мир,1990. – С. 196–250.
4. Ершов С.С., Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Чувствительность эритроцитов млекопитающих к изменению температурных и осмотических условий среды // Пробл. криобиологии. – 2004. – № 3. – С. 51–57.
5. Козлова Н.М., Лукьяненко Л.М., Антонович А.Н. и др. Окислительная модификация белков и физико-химическое состояние липидов в мембранах эритроцитов под действием диамида // Биофизика. – 2002. – **47**, № 3. – С. 500–505.
6. Мельникова О.В., Бондаренко Т.П. Модифицирующие действие глюкозы на эритроциты в условиях охлаждения и замораживания. – В кн.: Сб. науч. трудов: «Физико-химические процессы в криобиологических системах». – Харьков, 1991. – С. 68–78.
7. Поздняков В.В., Бондаренко В.А. Взаимосвязь между исходными осмотическими условиями среды и чувствительностью эритроцитов к гипертоническому стрессу в 4,0 М NaCl // Криобиология. – 1989. – №1. – С. 47-49.
8. Прайс В. Аналитическая атомно-абсорбционная спектроскопия. – М.: Мир, 1967. – 355 с.
9. Цымбал Л.В., Моисеев В.А. Исследование термоиндуцированных структурных изменений мембран эритроцитов методом спиновых зондов // Биол. мембраны. – 1985. – **6**, № 2. – С. 190–194.
10. Цымбал Л.В., Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Модификация хлорпромазином структурно-функционального состояния мембран эритроцитов // Там же. – 2005. – **22,** № 2. – С. 105–113.
11. Шереметьев Ю.А., Шереметьева А.В. Действие диамида на деформируемость и La(3+)-индуцированные агрегацию и слияние эритроцитов человека // Биофизика. – 2003. – **48**, № 2. – С. 256–258.
12. Шпакова Н.М., Бондаренко В.А. Модифицирующий эффект конканавалина А и диамида на чувствительность эритроцитов к холодовому шоку // Биохимия. – 1991. – **56**, № 5. – С. 923–929.
13. Шпакова Н.М., Панталер Е.Р., Бондаренко В.А. Антигемолитический эффект хлорпромазина при гиперосмотическом и холодовом шоке эритроцитов // Там же. – 1995. – **60**, № 10. – С. 1624–1631.
14. .Brahm J. Diffusional water permeability of human erythrocytes and their ghosts // J.Gen.Physiol. – 1982. – 79, № 5. – P. 791–819.
15. Deurticke B., Poser B., Lutkemeier P., Haest C.W. Formation of aqueous pores in the human erythrocyte membrane after oxidative cross-linking of spectrin by diamide // Biochim.Biophys.Acta. – 1983. – **731**, № 2. – P. 196–210.
16. Eskelinen S., Saukko P. The hypotonic hemolysis and the protective action of lysophosphatidylcholine // Biorheology. – 1984. – **21**, № 3. – P. 363–377.
17. Haest C., Kamp D., Plasa G., Deuticke B. Intra- and intermolecular cross-linking of membrane proteins in intact erythrocytes and ghosts by SH-oxidizing agents // Biochim. Biophys. Acta. – 1977. – **469**, № 2. – P. 226–230.
18. Hagerstrand H., Isomaa B. Amphiphile-induced antihaemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation

// Chem. Biol. Inter. – 1991. – **79**, №3. – P. 335–347.
19. Ihrig I., Hessel E., Seidler G. et al. Investigation of monovalent cation influxes of diamide-treated human erythrocytes in solutions of different ionic strength // Biochim. Biophys. Acta. – 1991. – **1069**, № 2. – P. 171–174.
20. Kaminoh Y, Kamaya H, Ueda I. Differential affinity of charged local anesthetics to solid-gel and liquid-crystalline states of dimyristoylphosphatidic acid vesicle membranes // Ibid. – 1989. – **987**, № 1. – P. 63–68.
21. Schreier S., Malheiros S.V., de Paula E. Surface active drugs: self-associated and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects // Ibid. – 2000. – **1508**, № 1. – P. 210–234.
22. Smith J.E. Erythrocyte deformability. – In: Red blood cells of domestic mammals/Ed. by N.S. Agar and P.G. Board. – Elsevier Science Publishers B.V., 1983. – P. 55–66.
23. Yamaguchi T, Kawamura H, Kimoto E, Tanaka M. Effects of temperature and pH on hemoglobin release from hydrostatic pressure-treated erythrocytes // J. Biochem. (Tokyo). – 1989. – **106**, № 6. – P. 1080–1085.

Ін-т проблем кріобіології і кріомедицини, Харків

Матеріал надійшов до редакції 01.11.2005