

С.С. Єршов, Н.А. Писаренко, Н.В. Орлова, Н.М. Шпакова

Вплив катіонних та аніонних амфіфільних сполук на гіпертонічний криогемоліз еритроцитів ссавців

Исследовано влияние представителей анионных (децил- и додецилсульфат натрия) и катионных (трифторпирозин, хлорпромазин) амфифильных соединений на морфологические особенности и гипертонический криогемолиз эритроцитов человека, кроля, быка и лошади. Указанные вещества вызывают изменение формы эритроцитов всех видов исследованных млекопитающих: анионные амфифилы – по типу дискоцит-эхиноцит, катионные амфифилы – дискоцит-стоматоцит. Выявлена значительная антигемолитическая активность исследованных веществ в условиях гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих. Наиболее эффективными являются катионный трифторпирозин и анионный децилсульфат натрия, причем последний гораздо активнее для эритроцитов животных по сравнению с клетками человека.

ВСТУП

Холодовий шок широко використовують для моделювання ситуації, що виникає при низькотемпературній консервації клітин [1]. Звичайно під холодним шоком розуміють пошкодження клітин при їх швидкому охолодженні у зоні позитивних температур. Пошкодження еритроцитів людини при охолодженні до 0°C спостерігається тільки у гіпертонічних середовищах. Для того, щоб підкреслити особливості розвитку холодного пошкодження еритроцитів відносно цих клітин використовують термін “гіпертонічний криогемоліз”. Гіпертонічний криогемоліз еритроцитів людини достатньо широко вивчений, встановлено особливості його розвитку залежно від складу і концентрації середовища, температури і тривалості інкубації клітин [2, 23]. Останнім часом у зв'язку з необхідністю використання крові і її компонентів у ветеринарній практиці зріс інтерес до проблеми довготривалого збереження еритроцитів тварин у замороженому стані [3]. Водночас вплив чинників криопошкодження на клітини різних видів тварин недостатньо вивчено.

Раніше було показано, що амфіфільні сполуки дають змогу значно зменшити рівень гіпертонічного криогемолізу еритроцитів людини [7, 10]. Найбільш значний антигемолітичний ефект мають заряджені амфіфільні речовини. Тому представляло інтерес дослідити ефективність аніонних і катіонних амфіфільних сполук в умовах гіпертонічного криогемолізу еритроцитів тварин і порівняти з клітинами людини. Як об'єкт дослідження було обрано еритроцити кроля, бика та коня, які відрізняються розмірами клітин, домінуючим внутрішньоклітинним катіоном, а також складом цитоскелет-мембранного комплексу [6, 13, 15, 24]. Наприклад, еритроцитарні мембрани тварин містять більше холестерину в порівнянні з мембранами еритроцитів людини [25]. Для еритроцитарних мембран бика є характерним високий вміст сфінгомієліну на відміну від плазматичних мембран еритроцитів інших видів ссавців [24], а цитоскелет еритроцитів коня не має білка смуги 4.2 [15]. Якщо еритроцити людини, кроля і коня містять як домінуючий катіон K^+ , то еритроцити бика – Na^+ [13].

© С.С. Єршов, Н.А. Писаренко, Н.В. Орлова, Н.М. Шпакова

Мета нашої роботи – провести порівняльне вивчення впливу представників аніонних (децил- і додецилсульфат натрію) і катіонних (трифторпіразин, хлорпромазин) амфифільних сполук на морфологічні особливості і гіпертонічний кріогемоліз еритроцитів людини, кроля, бика і коня.

МЕТОДИКА

У роботі були використані трифторпіразин, хлорпромазин (“Calbiochem”, США), децилсульфат натрію і додецилсульфат натрію (“Синтезпав”, Росія).

Еритроцити одержували з крові людини, кроля, бика і коня за загальноприйнятою методикою [10].

Усі використані середовища готували на 0,01 моль/л фосфатному буфері (рН 7,4). Гіпертонічний кріогемоліз еритроцитів проводили їх перенесенням у розчин, що містить 1,2 моль/л NaCl, та інкубуванням у ньому при 37 °С протягом 10 хв, після чого аліквоту переносили у розчин NaCl, охолоджений до 0 °С, на 10 хв. Кінцевий гематокрит – 0,4 %. Кількість гемоглобіну у супернатанті визначали спектрофотометрично ($\lambda=543$ нм). Амфифільну сполуку додавали в гіпертонічне середовище, що мало температуру 0°С, перед внесенням до нього клітин.

З одержаних залежностей гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів ссавців від концентрації амфифіла у середовищі були розраховані максимальна антигемолітична активність, розмір плато і ефективні концентрації. Антигемолітична активність амфифільної речовини – це відсоток зниження гемолізу клітин при наявності речовини відносно гемолізу у пробі, що не містить амфифіл. Плато – це діапазони концентрацій речовини, при яких спостерігається мінімальний гемоліз еритроцитів; середня ефективна концентрація – це концентрація речовини, що відповідає середині плато.

Морфологічний аналіз еритроцитів проводили методом світлової мікроскопії на мікроскопі STUDAR E (Польща) з фотографічною реєстрацією морфологічної картини крові цифровою фотокамерою CANON PowerShot A510. Реакцію клітин на введення амфифільних сполук оцінювали у краплі, що була рівномірно розподілена тонким шаром. У морфологічній оцінці особливостей форми і поверхневої архітекτονіки еритроцитів використовували загальноприйняту класифікацію [12].

Експериментальні результати наведено як середнє арифметичне \pm стандартна похибка середнього. Аналіз результатів проведено за допомогою методу Манна-Уїтні та тестів ANOVA. Розходження між групами вважали статистично вірогідними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ

Амфифільні сполуки, що досліджувалися, представлені аніонними речовинами – похідними алкілсульфатів з довжиною алкільного ланцюга 10 і 12 вуглецевих атомів (C10 і C12 відповідно) і катіонними – похідними фенілгідразину – трифторпіразином (ТФП) і хлорпромазином (ХПР). Амфифільна природа вказаних сполук дає змогу їх молекулам розподілятися в еритроцитарній мембрані, що виявляється у зміні морфології клітин. На рис.1 представлено еритроцити коня, що були проінкубовані з аніонними і катіонними амфифілами. За наявності негативно заряджених речовин вони мають ехіноцитарні форми, тоді як позитивно заряджені сполуки спричиняють перехід дискоцитів у стоматоцити. Аналогічні морфологічні особливості клітин при наявності досліджуваних амфифільних сполук виявлено для еритроцитів людини [5], кроля, бика.

У разі вивчення залежності розвитку гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів тварин і людини від концентрації хлорис-

того натрію був виявлений достатньо високий рівень гемолізу клітин ссавців у середовищі, що містить 1,2 моль/л NaCl [4]. При охолодженні клітин від 37 до 0°C у зазначеному середовищі найвищий рівень гіпертонічного пошкодження притаманний еритроцитам людини і коня (81±6 і 83 % ± 5 % відповідно), проміжний – для клітин кроля (61 % ± 5 %) і низький – для еритроцитів бика (40 % ± 4 %).

Антигемолітичну активність амфіфільних сполук при гіпертонічному криогемолізі еритроцитів різних видів ссавців представлено на рис.2. Видно, що при охолодженні еритроцитів у гіпертонічному середовищі амфіфільні сполуки проявляють достатньо значну антигемолітичну активність. Представники аніонних амфіфілів (С10 і С12) є більш ефективними для еритроцитів тварин у порівнянні з клітинами людини. Крім того, коротколанцюговий гомолог алкілсульфату С10 проявляє більш значний

захисний ефект порівняно з довголанцюговим С12. Водночас для еритроцитів людини і коня виявляється зниження ефективності С12 у порівнянні з С10 у 3–4 рази, тоді для еритроцитів кроля і бика – всього на 10–15 %.

Для позитивно заряджених амфіфілів (ТФП і ХПР) спостерігаються високі значення антигемолітичної активності у разі гіпертонічного криогемолізу еритроцитів людини і кроля. Для еритроцитів людини і кроля рівень антигемолітичної активності ТФП становить 80–85 %, тоді як для клітин бика і коня – приблизно 65%. Антигемолітична активність ХПР дещо нижча, ніж ефективність ТФП. У разі еритроцитів людини і кроля антигемолітична активність ХПР становить приблизно 70 %, для клітин бика – 43 %.

У таблиці представлено діапазони концентрацій амфіфільних речовин, при яких реєструється мінімальний рівень гіпертоніч-

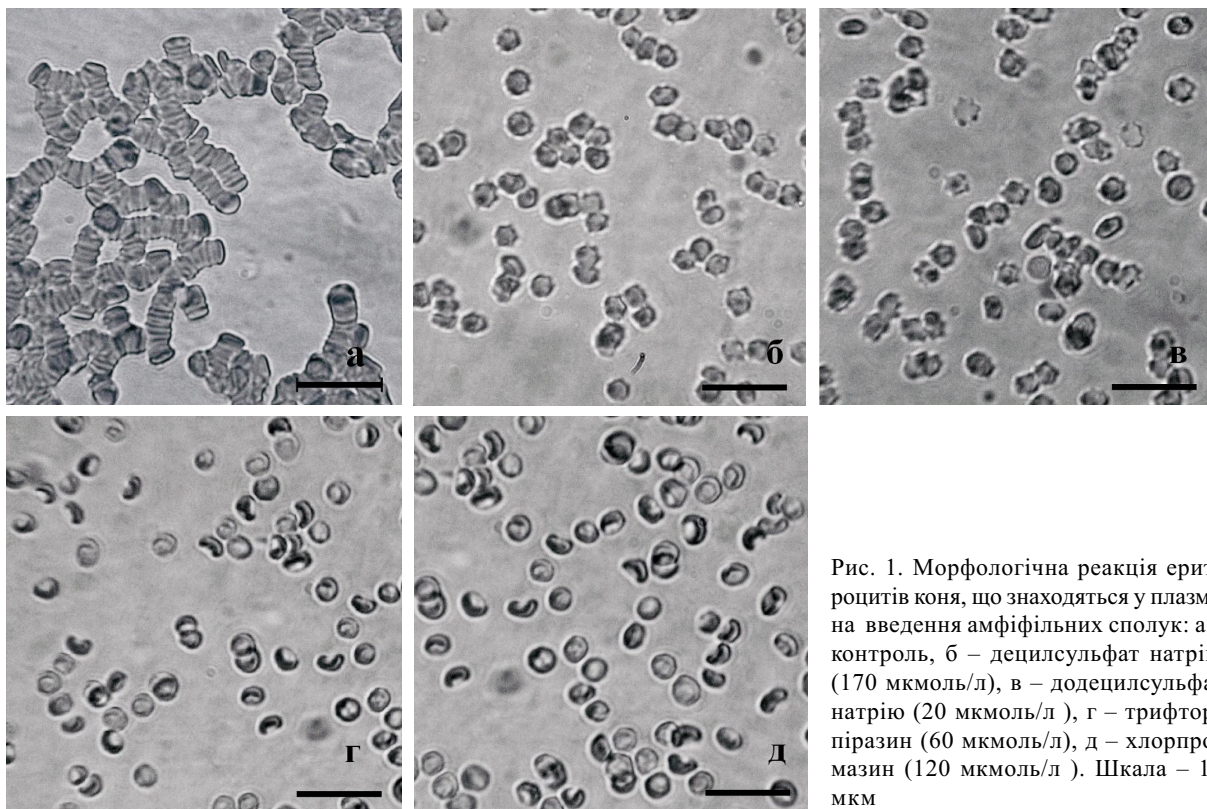


Рис. 1. Морфологічна реакція еритроцитів коня, що знаходяться у плазмі, на введення амфіфільних сполук: а – контроль, б – децилсульфат натрію (170 мкмоль/л), в – додецилсульфат натрію (20 мкмоль/л), г – трифторпіразин (60 мкмоль/л), д – хлорпромазин (120 мкмоль/л). Шкала – 17 мкм

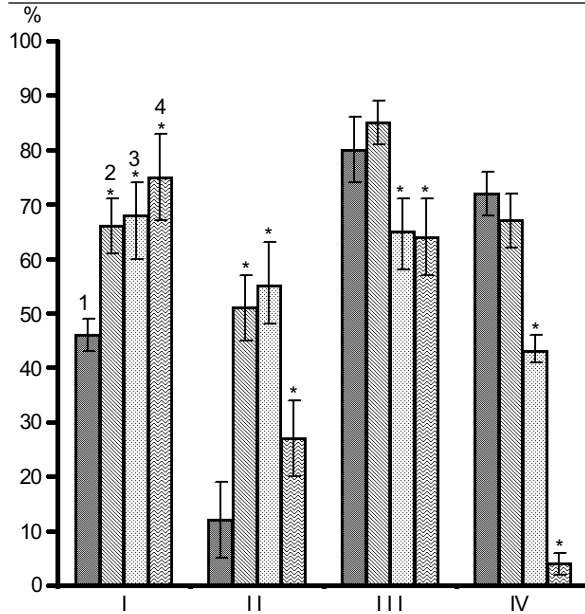


Рис. 2. Значення максимальної антигемолітичної активності амфіфільних сполук при їх використанні у середніх ефективних концентраціях в умовах гіпертонічного криогемолізу еритроцитів різних видів ссавців (n=6): 1 – людина, 2 – кріль, 3 – бик, 4 – кінь; I – С10, II – С12, III – трифторпіразин, IV – хлорпромазин. * P<0,05 порівняно з еритроцитами людини

ного криогемолізу еритроцитів (плато) і значення середніх ефективних концентрацій ($C_{\text{ср.еф.}}$). С10, на відміну від С12, має достатньо широке плато для еритроцитів ссавців і вищі (приблизно на порядок) значення $C_{\text{ср.еф.}}$ (у разі еритроцитів людини – приблизно на 2 порядки). Найбільш

вузький діапазон ефективних концентрацій обох алкілсульфатів спостерігається для еритроцитів людини у порівнянні з клітинами тварин. Для ТФП характерні відносно невеликі діапазони ефективних концентрацій, що перекриваються, при гіпертонічному криогемолізі еритроцитів усіх ссавців і, як наслідок, приблизно однакові $C_{\text{ср.еф.}}$ амфіфіла. Діапазон ефективних концентрацій ХПР залежить від видових особливостей еритроцитів: наприклад, достатньо широке плато амфіфіла для еритроцитів кроля (40–200 мкмоль/л) і дуже вузьке для клітин бика (5–15 мкмоль/л).

Таким чином, в умовах гіпертонічного криогемолізу еритроцитів ссавців найбільш ефективними є катіонний ТФП і аніонний С10, причому останній більш активний для еритроцитів тварин у порівнянні з клітинами людини.

ОБГОВОРЕННЯ

Гіпертонічний криогемоліз еритроцитів полягає в інкубації клітин у гіпертонічному середовищі при 37°C з наступним швидким охолодженням і інкубацією при 0°C. На першому етапі (інкубація в гіпертонічному середовищі при 37°C) відбувається вихід іонів калію з еритроцитів через трансмембранні мікродефекти [8], які на другому етапі (охолодження) збільшуються до розміру

Величини діапазону ефективних концентрацій (плато) і значення середніх ефективних концентрацій амфіфільних сполук при гіпертонічному криогемолізі еритроцитів різних видів ссавців ($M \pm m$, n=6)

Речовина	Людина	Кріль	Бик	Кінь	
С10	Плато, мкмоль/л	50±20–160±20	30±10–400±40	80±10–280±30	60±20–280±40
	$C_{\text{ср.еф.}}$, мкмоль/л	105	215	180	170
С12	Плато, мкмоль/л	2,5±1,0–5±0,0	10±3–40±15	10±2–40±0	10±7–30±10
	$C_{\text{ср.еф.}}$, мкмоль/л	2,5	25	25	20
Трифторпіразин	Плато, мкмоль/л	40±6–80±14	40±5–80±10	40±4–80±6	50±5–70±10
	$C_{\text{ср.еф.}}$, мкмоль/л	60	60	60	60
Хлорпромазин	Плато, мкмоль/л	100±10–140±10	40±10–200±20	5±2–15±2	—
	$C_{\text{ср.еф.}}$, мкмоль/л	120	120	10	—

гемолітичних пор, що і призводить до розвитку гемолізу еритроцитів.

При дослідженні впливу амфіфільних речовин на розвиток гіпотонічного лізису еритроцитів людини було показано [16, 17], що ці речовини змінюють форму клітин. Згідно з гіпотезою спряжених моношарів ліпідного бішару [19, 20], переважне вбудовування екзогенних молекул в один з моношарів визначатиме характер трансформації еритроцитів. Аніонні амфіфіли, переважно вбудовуючись у зовнішній моношар еритроцитарної мембрани, призводять до збільшення площі цього моношару відносно внутрішнього і викликають трансформацію клітин за типом дискоцит-ехіноцит. Катіонні амфіфіли переважно вбудовуються у внутрішній моношар, що спричинює трансформацію еритроцитів за типом дискоцит-стоматоцит. Морфологічні особливості еритроцитів ссавців за наявності амфіфілів (див. рис.1), а також фізико-хімічні властивості молекул речовин свідчать на користь того, що представники аніонних сполук (C10 і C12) розподіляються в зовнішній моношар ліпідного бішару, тоді як позитивно заряджені молекули ТФП і ХПР - у внутрішній.

Takahashi та співавт. [22] вважають, що в основі гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів ссавців лежать процеси, які пов'язані з перерозподілом холестерину у мембрані. Згідно з даними інших авторів [21, 24], холестерин переважно знаходиться у зовнішньому моношарі фосfolіпідного бішару мембрани, в який вбудовуються і молекули аніонних амфіфілів. Низька ефективність C10 і C12 при гіпертонічному кріогемолізу еритроцитів людини (див. рис.2) можливо зумовлена меншим вмістом холестерину в їх мембранах у порівнянні з клітинами тварин [25].

Виявлена висока антигемолітична активність ТФП для еритроцитів усіх ссавців можливо спричинена його здатністю вбудовуватися практично у будь-яку мембрану і

ефективно пертурбувати її. Протектуючий ефект ХПР проявляється меншою мірою, що особливо помітно при гіпертонічному кріогемолізу еритроцитів бика і коня.

Катіонні амфіфільні сполуки (ТФП і ХПР), що були використані, є ефективними інгібіторами кальмодуліну, білка, який бере участь у багатьох біохімічних процесах в еритроцитах [11]. Висловлене раніше припущення про те, що антигемолітична активність ХПР опосередкована його впливом на регуляторний білок [9], не знайшло свого підтвердження. Попередня обробка еритроцитів ХПР сама по собі неефективна і речовина повинна знаходитися в середовищі у момент дії стресового чинника [10]. Це свідчить на користь гіпотези, запропонованої Hagerstrand [16, 18], про те, що антигемолітична дія амфіфілів, що відносяться до різних класів, пов'язана з їх здатністю пертурбувати ліпідний бішар мембрани. Мабуть така пертурбація мембрани молекулами амфіфільної речовини у момент швидкого охолодження клітин, що знаходяться у гіпертонічному середовищі, перешкоджає збільшенню трансмембранного мікродефекта до пори, що за розмірами близька до молекули гемоглобіну. Можна вважати, що пертурбуюча активність амфіфільних сполук визначається, з одного боку, фізико-хімічними властивостями їх молекул, з іншого – складом і станом еритроцитарних мембран.

Еритроцити ссавців, що досліджувалися, розрізняються розмірами (об'ємом, площею поверхні і т.д.): клітини людини і кроля відносяться до відносно великих, еритроцити бика і коня – до маленьких [6, 14]. Виходячи з того, що сумарна площа поверхні маленьких клітин більша, ніж за великих клітин, що знаходяться в одиниці об'єму, можна припустити, що ефективні концентрації амфіфільних сполук будуть вищі у разі еритроцитів коня і бика. Дійсно, це припущення правильне для діапазону ефективних концентрацій аніонних амфіфі-

лів в умовах гіпертонічного криогемолізу еритроцитів людини, коня і бика, але не кроля (див. таблицю). Крім того, це не відноситься до катіонних амфіфілів. Одержані результати свідчать на користь того, що першорядними у прояві антигемолітичної активності амфіфілів є не загальна площа поверхні клітин, а видові особливості еритроцитарних мембран, що зумовлені їх фізико-хімічними властивостями.

**S.S. Ershov, N.A. Pisarenko, N.V. Orlova,
N.M. Shpakova**

EFFECT OF CATIONIC AND ANIONIC AMPHIPHILIC COMPOUNDS ON HYPER- TONIC CRYOHEMOLYSIS OF MAMMALIAN RED BLOOD CELLS

We studied the effect of derivatives of anionic (sodium decyl- and dodecyl- sulphate) and cationic (trifluoperazine, chlorpromazine) amphiphilic compounds on morphological peculiarities and hypertonic cryohemolysis of human, rabbit, bovine, equine red blood cells. The mentioned substances cause changes in red blood cell shape for all the studied mammals: anionic amphiphils on the discocyte-echinocyte type and cationic ones on discocyte-stomatocyte type. It was revealed a significant antihemolytic activity of the studied substances under hypertonic cryohemolysis of mammalian red blood cells with manifested species differences in the efficiency. The most effective are cationic trifluoperazine and anionic sodium decylsulphate, moreover the latter is much more active for animal red blood cells if compared with human ones.

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine,
Kharkov*

V.N. Karazin's Kharkov National University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. – К.: Наук. думка, 1994. – 432 с.
2. Гордиенко Е. А., Коваленко С. Е. Основные закономерности явления гипертонического криогемоліза // Пробл. криобиологии. – 1997. – № 3. – С. 3–7.
3. Денисова О. Н. Криочувствительность эритроцитов различных видов млекопитающих: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 2006. – 20 с.
4. Єршов С.С., Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Порівняльний аналіз гіпертонічного криогемолізу еритроцитів різних видів тварин при зміні осмотичних і температурних умов середовища // Біологія тварин. – 2006. – 8, №1–2. – С. 123–129.
5. Кулешова Л.Г Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Антигемолитическая и трансформирующая активность амфифильных соединений // Пробл. криобиологии. – 2001. – № 1. – С. 9–15.
6. Начала физиологии / Под.ред.акад. А.Д. Ноздрачева.– СПб; Лань, 2001. – 1088 с.
7. Орлова Н.В. Вплив амфифільних сполук на осмотичну і температурну чутливість еритроцитів: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харків, 2001. – 17 с.
8. Шпакова Н. М., Бондаренко В. А. Действие хлорпромазина на температурную и осмотическую чувствительность эритроцитов // Биохимия. – 1991. – 56, № 12. – С. 2125–2130.
9. 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.
10. Шпакова Н.М., Панталер О.Р. Інгібітори кальмодуліну та холодовий шок еритроцитів Тез.доп. VI Укр. біохім. з'їзду. – К., 1992. – Ч.І. – С. 107.
11. Bereza U., Brewer G., Misukami I. Association of calmodulin inhibition, erythrocyte membrane stabilization and pharmacological effects of drugs // Biochim. Biophys. Acta. – 1982. – 692, № 2. – P. 305–314.
12. Bessis M. Red cell shapes. An illustrated classification and its rationale. In: Red Cell Shape; Physiology, Pathology, Ultrastructure, Springer-Verlag. – Heidelberg, 1973. – P. 1–24.
13. Bogner P., Sipos K., Ludany A. et al. Steady-state volumes and metabolism-independent osmotic adaptation in mammalian erythrocytes// Eur. Biophys. J. –2002. – 31, № 2. –P.145–152
14. Garnier M., De Preville G., Pilardeau T.P., Boudia D. Relationship between the intra-erythrocyte sodium composition and the membrane lipoprotein composition among different mammal species // Comp. Biochem. Physiol. – 1984. – 77A, № 2. – P. 315–317.
15. Guerra-Shinohara E.M., Barretto O.C. The erythrocyte cytoskeleton protein 4.2 is not demonstrable in several mammalian species// Braz. J. Med. Biol. Res. – 1999. – 32, № 6. – P. 683–687.
16. 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.
17. Isomaa B., Hagerstrand H., Paatero G. Shape transformations induced by amphiphiles in erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta. – 1987. – 809, № 1. – P. 93–103.
18. Isomaa B., Hagerstrand H., Paatero G., Engblom A.C. Permeability alterations and antihaemolysis induced by amphiphiles in human erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta. – 1986. – 860, № 3 – P. 510–524.
19. Lim H.W.G., Wortis M., Mukhopadhyay R. Stomatocyte-discocyte-echinocyte sequence of the human red blood cell: Evidence for the bilayer-couple hypothesis from membrane mechanics // Proc. Natl. Acad. Sci.

- USA. – 2002. – **99**, № 26. – P. 16766–16769.
20. Sheetz M.P., Singer S.J. Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions// *Ibid.* – 1974. – **71**, № 11. – P. 4457–4461.
21. Simons K., Vaz W.L. Model systems, lipid rafts, and cell membranes// *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 2004. – **33**. – P. 269–295.
22. Takahashi T., Noji S., Erbe E.F. et al. Cold shock hemolysis in human erythrocytes studied by spin probe method and freeze-fracture electron microscopy// *Biophys. J.* – 1986. – **49**, №.2. – P. 403–410.
23. Takahashi T., Williams R. J. Thermal shock hemolysis in human red cells. I. The effects of temperature, time, and osmotic stress // *Cryobiology.* – 1983. – **20**, № 5. – P. 507–520.
24. Virtanen J. A., Cheng K. H., Somerharju P. Phospholipid composition of the mammalian red cell membrane can be rationalized by a superlattice model// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – **95**, №. 9. – P. 4964–4969.
25. Wessels J.M., Veerkamp J.H. Some aspects of the osmotic lysis of erythrocytes III. Comparison of glycerol permeability and lipid composition of red blood cell membranes from eight mammalian species // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1973. – **291**, № 1. – P. 190–196.

*Ин-т проблем кріобіології і кріомедицини НАН
України, Харків;
Харків. нац. ун-т ім. В.Н. Каразіна*

*Матеріал надійшов до
редакції 21.05.2007*