

DOI: 10.26693/jmbs05.04.401

УДК 536.352.462:612.111

Шпакова Н. М., Орлова Н. В., Єршов С. С.,  
Ніпот О. Є., Шапкіна О. О.ТЕМПЕРАТУРНО-ОСМОТИЧНА ЧУТЛИВІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ  
ЛЮДИНИ І КОНЯ В ПРИСУТНОСТІ ХЛОРПРОМАЗИНУІнститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,  
Харків

nipotel71@gmail.com

У порівняльному аспекті досліджено чутливість еритроцитів людини і коня до гіпертонічного шоку (4,0 моль/л NaCl) в умовах спільної дії температури, попереднього часткового зневоднення клітин і амфифільної речовини хлорпромазину. Показано, що найменший рівень гіпертонічного гемолізу контрольних еритроцитів людини і коня (за відсутності хлорпромазину) спостерігається при спільному використанні попередньої інкубації клітин в 0,4 моль/л NaCl і низької температури. У всіх випадках рівень гіпертонічного гемолізу контрольних клітин коня нижче, ніж еритроцитів людини. Цей факт свідчить про те, що еритроцити коня більш стійкі до дії гіпертонічного шоку. Відомо, що на відміну від багатьох еритроцитів ссавців, клітини коня позбавлені одного з компонентів цитоскелетного комплексу – білка смуги 4.2. Цей білок зв'язується з цитоплазматичним доменом білка смуги 3 і взаємодіє з анкирином в еритроцитах людини. Можливо, особливість складу цитоскелет-мембранного комплексу еритроцитів коня відповідає за більшу їх стійкість до дії гіпертонічного шоку в порівнянні з клітинами людини. Встановлено, що використання хлорпромазину знижує рівень гіпертонічного ушкодження еритроцитів людини і коня, початково проінкубованих в середовищі, що містить як 0,15 моль/л, так і 0,4 моль/л NaCl при 37 і 0°C. У цих умовах величини максимальної антигемолітичної активності хлорпромазину досить високі і знаходяться в діапазоні 38-83%. Незважаючи на різний рівень вихідного ушкодження еритроцитів (перенесених в 4,0 моль/л NaCl з 0,15 моль/л або 0,4 моль/л NaCl) і значень мінімального гемолізу в присутності хлорпромазину, ефективність речовини схожа для клітин людини і коня при 37°C і відрізняється при 0°C. В умовах низької температури антигемолітична активність хлорпромазину при використанні клітин людини в 1,2-1,4 рази вище.

**Ключові слова:** еритроцити людини і коня, гіпертонічний шок, часткове зневоднення, температура, хлорпромазин.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота виконана відповідно до наукового напрямку досліджень відділу кріоцитології ІПКіК НАН України «Дослідження чутливості еритроцитів ссавців до охолодження, дегідратації і заморожування при дії модифікуючих факторів і кріопротекторів», № держ. реєстрації 0114U0001318.

**Вступ.** Одним з основних факторів, що визначають пошкодження клітин за умов заморожування, є дія висококонцентрованих розчинів солей, що утворюються в позаклітинному середовищі в результаті виморожування води. Дію на клітини високої концентрації NaCl (4,0 моль/л), широко використовують в модельному експерименті, який має назву гіпертонічний шок (ГШ).

Наразі існують три способи зниження рівня гіпертонічного гемолізу еритроцитів: перший – пов'язаний з модифікацією клітин на етапах, що передують стресовому впливу, другий – із додаванням речовин, які захищають клітини в момент дії стресового чинника і третій – із впливом на клітини низької температури (0°C). Так, раніше було встановлено, що попереднє часткове зневоднення еритроцитів ссавців підвищує їх стійкість до подальшої дії ГШ [1]. Присутність в літичному середовищі в момент внесення еритроцитів амфифільних сполук (зокрема хлорпромазину) дозволяє цим речовинам проявляти високу антигемолітичну активність [2]. Відомо, що перенесення еритроцитів у висококонцентровані гіпертонічні середовища супроводжується температурно-залежним пошкодженням клітин: при температурі 0°C рівень гемолізу еритроцитів нижче, ніж при 37 °C [1].

Дослідженню дії окремих або двох факторів (з перерахованих вище) на чутливість еритроцитів до ГШ приділялася велика увага [1, 2], проте недостатньо даних щодо спільного впливу трьох чинників (температура 0°C, попереднє часткове зневоднення, хлорпромазин) на рівень гемолізу клітин в середовищі, що містить 4,0 моль/л NaCl. Механізм пошкодження еритроцитів за умов дії ГШ пов'язаний з утворенням трансмембранних пір, на

формування яких може впливати як екзогенні (температура, попереднє часткове зневоднення, амфифільні речовини), так і ендогенні (видові особливості еритроцитів ссавців) фактори.

Плазматичні мембрани еритроцитів різних видів ссавців розрізняються за білково-ліпідним складом [3, 4]. Так, на відміну від еритроцитів інших ссавців, клітини коня не містять білок смуги 4.2, який відноситься до якірних білків, що зв'язують інтегральні білки мембрани з цитоскелетним комплексом [5].

Доцільно було б в порівняльному аспекті дослідити чутливість еритроцитів людини і коня до дії ГШ за умов зміни температури, попереднього часткового зневоднення клітин і впливу хлорпромазину.

**Мета дослідження.** Вивчити спільний вплив трьох чинників, таких як температура, попереднє часткове зневоднення і хлорпромазин на чутливість еритроцитів людини і коня до дії гіпертонічного шоку (4,0 моль/л NaCl).

**Матеріал та методи дослідження.** Еритроцити одержували з донорської крові за загальноприйнятою методикою [2]. Всі середовища готували на 0,01 моль/л фосфатному буфері, рН 7,4. У роботі використовували хлорпромазин (ХПР) фірми "Calbiochem". Гіпертонічний шок проводили наступним чином. За допомогою поршневого дозатора Gilson по 50 мкл осаду еритроцитів переносили в 0,5 мл розчину NaCl (0,15 моль/л або 0,4 моль/л) і інкубували 2 хв при температурі 37 або 0°C (етап попередньої інкубації). Потім з кожної проби 50 мкл суспензії еритроцитів переносили в 1 мл 4,0 моль/л NaCl (етап гіпертонічного шоку), що містив ХПР, при постійній температурі (37 або 0°C). Після цього клітини осаджували центрифугуванням і при довжині хвилі 543 нм спектрофотометрично визначали кількість гемоглобіну в супернатанті. Вихід гемоглобіну з клітин розраховували у відсотках по відношенню до 100% гемолізу клітин у присутності тритона X-100 (0,1%). Ефективна концентрація ХПР відповідає мінімальному значенню рівня гемолізу еритроцитів. Значення максимальної антигемолітичної активності ХПР розраховували за формулою:

$$AG_{\max} = (k/k - a/k) \times 100\%, \text{ де}$$

k – рівень гемолізу еритроцитів у відсутності ХПР;  
a – мінімальний рівень гемолізу еритроцитів у присутності ХПР.

Кожен експеримент проводили не менше 6 разів з використанням двох паралельних проб. Для всіх зразків проводили обчислення середнього арифметичного значення і значення середньоквадратичної помилки ( $M \pm m$ ).

### Результати дослідження та їх обговорення.

У таблиці 1 і 2 представлені значення рівня гемолізу еритроцитів людини і коня в середовищі, що містить 4,0 моль/л NaCl, при визначених концентраціях ХПР за різних умов попередньої інкубації клітин (0,15 або 0,4 моль/л NaCl, 37 або 0°C). Вибір концентрації NaCl на етапі попередньої інкубації клітин обумовлений тим, що часткове зневоднення еритроцитів людини і коня в середовищі 0,4 моль/л є оптимальним для отримання максимальної стійкості клітин до подальшої дії ГШ [1, 2].

**Таблиця 1** - Вплив попередньої інкубації в середовищах 0,15 моль/л і 0,4 моль/л NaCl і температури на рівень гемолізу еритроцитів людини в 4,0 моль/л NaCl у присутності хлорпромазину

Концентрація хлорпромазину, мкмоль/л	Рівень гемолізу, %			
	0,15 → 4,0 моль/л NaCl		0,4 → 4,0 моль/л NaCl	
	37°C	0°C	37°C	0°C
0 (контроль)	84±7	71±6	38±4	20±3
20	60±5	28±4	33±3	11±2*
40	38±4	38±4	30±3	22±3
60	25±4	62±5	19±3	28±4
80	23±3	64±6	17±2	51±6
100	20±2	73±7	16±2	62±6
120	17±2	75±8	13±2	70±7
140	25±3	80±8	18±3	80±8
160	57±5	86±9	67±6	83±8

**Примітка:** \* – статистично значущі відмінності у порівнянні з контролем (p < 0, 05).

**Таблиця 2** – Вплив попередньої інкубації в середовищах, що містять 0,15 моль/л і 0,4 моль/л NaCl, і температури на рівень гемолізу еритроцитів коня в 4,0 моль/л NaCl у присутності хлорпромазину

Концентрація хлорпромазину, мкмоль/л	Рівень гемолізу, %			
	0,15 → 4,0 моль/л NaCl		0,4 → 4,0 моль/л NaCl	
	37°C	0°C	37°C	0°C
0 (контроль)	47±5	20±3	32±4	16±3
20	24±3	11±3*	26±4	10±2*
40	12±2	22±4	22±3	14±3
60	11±2	74±6	15±2	50±6
80	8±2	80±7	10±2	68±6
100	11±2	83±8	20±3	85±7
120	16±3	90±8	25±4	87±8
140	20±3	89±9	35±4	88±9
160	38±5	92±9	37±5	90±9

**Примітка:** \* – статистично значущі відмінності у порівнянні з контролем (p < 0, 05).

Як і слід було очікувати, рівень гемолізу контрольних еритроцитів людини і коня (за відсутності ХПР), перенесених з середовища, що містить 0,4 моль/л NaCl, в 4,0 моль/л NaCl значно нижче, ніж гіпертонічне пошкодження клітин, які попередньо перебували в фізіологічному розчині (табл. 1, 2). Видно, що найменший рівень гіпертонічного гемолізу контрольних еритроцитів людини і коня спостерігається при спільному використанні попередньої інкубації клітин в 0,4 моль/л NaCl і низької температури.

Додаткове використання ХПР знижує рівень гіпертонічного пошкодження еритроцитів людини і коня, початково проінкубованих в середовищі, що містить як 0,15 моль/л, так і 0,4 моль/л NaCl за температури 37 і 0°C (табл. 1, 2). Слід зазначити, що при 37°C ефективні концентрації ХПР складають 120 і 80 мкмоль/л для еритроцитів людини і коня відповідно. При температурі 0°C мінімальні значення гіпертонічного гемолізу еритроцитів людини і коня спостерігаються при використанні більш низької концентрації ХПР (20 мкмоль/л).

Крім загальних закономірностей, що були відзначені для гіпертонічної чутливості еритроцитів людини і коня за досліджуваних умов (табл. 1, 2), слід зазначити особливості реакції клітин коня на дію ГШ в порівнянні з еритроцитами людини. Так, у всіх випадках рівень гіпертонічного гемолізу контрольних клітин коня нижче, ніж еритроцитів людини. Цей факт свідчить про те, що еритроцити коня більш стійкі до дії ГШ.

Вважають, що чутливість еритроцитів до дії стресових факторів визначається станом їх цитоскелет-мембранного комплексу [6]. Можливо, особливість складу цитоскелет-мембранного комплексу еритроцитів коня (відсутність білка смуги 4,2 [5]) зумовлює їх стійкість до ГШ в порівнянні з клітинами людини.

Звертає на себе увагу той факт, що ХПР досить ефективний за умов ГШ еритроцитів людини і коня незалежно від рівня вихідного пошкодження клітин. Для того, щоб порівняти протекуючу дію ХПР за різних умов і усунути внесок інших факторів (попередньої інкубації клітин і температури) в зміну рівня гіпертонічного гемолізу еритроцитів, ми використовували поняття максимальної антигемолітичної активності речовини. Як видно з даних **таблиці 3**, величини максимальної антигемолітичної активності ХПР досить високі і знаходяться в діапазоні 38–83%. Незважаючи на різний рівень вихідного гіпертонічного пошкодження еритроцитів і значень мінімального гемолізу в присутності ХПР, його ефективність схожа для клітин людини і коня при 37°C. Відмінності в ефективності ХПР для еритроцитів людини і коня за умов дії ГШ виявляються

**Таблиця 3** – Значення ефективних концентрацій та максимальної антигемолітичної активності хлорпромазину при перенесенні еритроцитів людини і коня з середовищ попередньої інкубації: 0,15 моль/л і 0,4 моль/л NaCl в 4,0 моль/л NaCl при 37 і 0°C

Видова приналежність еритроцитів	Температура	Ефективна концентрація, мкмоль/л	Антигемолітична активність, %	
			0,15 → 4,0 моль/л NaCl	0,4 → 4,0 моль/л NaCl
людина	37°C	120	80	66
	0°C	20	61	45
кінь	37°C	80	83	68
	0°C	20	45	38

при 0°C: для клітин людини антигемолітична активність ХПР в 1,2–1,4 рази вища (**табл. 3**).

Молекули ХПР вбудовуються в еритроцитарну мембрану і переважно розподіляються у внутрішньому моношарі ліпідного бішару [7, 8]. На користь цього свідчать особливості трансформації еритроцитів за типом дискоцит-стоматоцит [9]. Оскільки ХПР знаходиться в літичному середовищі перед внесенням клітин, то речовина проявляє антигемолітичну активність безпосередньо в момент дії на клітини стресового чинника. Відповідно до гіпотези, запропонованої Хагестреном [10], молекули амфільної речовини, вбудовуючись в мембрану в момент дії стресового чинника, здатні тимчасово розупорядковувати її, роблячи мембрану більш лабільною, тим самим запобігаючи її руйнуванню.

Розподіл молекул ХПР в плазматичній мембрані еритроцитів носить гетерогенний характер. Плазматичні мембрани еритроцитів різних видів ссавців розрізняються за ліпідним складом [4]. Можливо при 0°C місця вбудовування молекул ХПР в мембрану змінюються (за рахунок структурного переходу деяких ліпідів при 0°C) і відрізняються для еритроцитів людини і коня, що і призводить до відмінностей в прояві антигемолітичної активності ХПР за низької температури.

**Висновки.** Отже, спільний вплив трьох чинників, таких як низька температура, попереднє часткове зневоднення клітин (0,4 моль/л NaCl) і ХПР підвищують стійкість людини і коня до дії ГШ (4,0 моль/л NaCl). Для клітин людини і коня ефективність ХПР схожа при 37°C і відрізняється при 0°C. А саме, за умов низької температури антигемолітична активність ХПР для еритроцитів людини в 1,2–1,4 рази вища.

**Перспективи подальших наукових досліджень.** Подальші дослідження будуть направлені на пошук взаємозв'язку між показниками температурно-осмотичної чутливості еритроцитів ссавців і структурно-функціональними характеристиками цих клітин.

## References

1. Shpakova NM, Orlova NV, Iershov SS, Iershova NA, Aleksandrova DI. Temperature and osmolarity as factors determining resistance of mammalian erythrocytes to hypertonic shock. *Bulletin of problems of biology and medicine*. 2015; 3(1): 242-6. [Russian]
2. Semionova EA, Chabanenko EA, Orlova NV, Zubov PM, Shpakova NM. About mechanism of antihemolytic action of chlorpromazine under posthypertonic stress in erythrocytes. *Problems of Cryobiology*. 2017; 27(3): 219-29. [Russian]
3. Matei H, Frentescu L, Benga Gh. Comparative studies of the protein composition of red blood cell membranes from eight mammalian species. *J Cell Mol Med*. 2000; 4(4): 270-6.
4. Ferlazzo AM, Bruschetta G, Di Pietro P, Medica P, Notti A, Rotondo E. Phospholipid composition of plasma and erythrocyte membranes in animal species by  $^{31}\text{P}$  NMR. *Vet Res Commun*. 2011; 35: 521-30.
5. Baskurt OK, Farley RA, Meiselman HJ. Erythrocyte aggregation tendency and cellular properties in horse, human, and rat: a comparative study. *Am J Physiol*. 1997; 273(6)(Pt 2): H2604-12.
6. Li Ju, Lykotrafitis G, Dao M, Suresh S. Cytoskeletal dynamics of human erythrocyte. *PNAS*. 2007; 104(12): 4937-42.
7. Manaargadoo-Catin M, Ali-Cheri A, Pognas J-L, Perrin C. Hemolysis by surfactant – a review. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2015; 228: 1-16.
8. Jiang Yao-Wen, Gao Ge, Chenb Zhan, Wu Fu-Gen. Fluorescence studies on the interaction between chlorpromazine and model cell membranes. *New J Chem*. 2017; 41: 4048-57.
9. Chen JY, Brunauer LS, Chu FC, Helsel CM, Gedde MM, Huestis WH. Selective amphipathic nature of chlorpromazine binding to plasma membrane bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2003; 1616(1): 95-105.
10. Hagerstrand H, Isomaa B. Amphiphile-induced antihaemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation. *Chemico-biological interactions*. 1991; 79: 335-47.

УДК 536.352.462:612.111

### ТЕМПЕРАТУРНО-ОСМОТИЧЕСКАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА И ЛОШАДИ В ПРИСУТСТВИИ ХЛОРПРОМАЗИНА

**Шпакова Н. М., Орлова Н. В., Ершов С. С., Нипот Е. Е., Шапкина О. А.**

**Резюме.** В сравнительном аспекте исследована чувствительность эритроцитов человека и лошади к гипертоническому шоку (4,0 моль/л NaCl) в условиях совместного действия температуры, предварительного частичного обезвоживания клеток и хлорпромазина. Показано, что наименьший уровень гипертонического гемолиза контрольных эритроцитов человека и лошади (в отсутствие хлорпромазина) наблюдается при совместном использовании предварительной инкубации клеток в 0,4 моль/л NaCl и низкой температуры. Во всех случаях уровень гипертонического гемолиза контрольных клеток лошади ниже, чем эритроцитов человека. Этот факт свидетельствует о том, что эритроциты лошади более устойчивы к действию гипертонического шока. Известно, что в отличие от многих эритроцитов млекопитающих клетки лошади лишены одного из компонентов цитоскелетного комплекса – белка полосы 4.2. Этот белок связывается с цитоплазматическим доменом белка полосы 3 и взаимодействует с анкирином в эритроцитах человека. Возможно, особенность состава цитоскелет-мембранного комплекса эритроцитов лошади ответственна за большую их устойчивость к действию гипертонического шока по сравнению с клетками человека. Установлено, что использование хлорпромазина снижает уровень гипертонического повреждения эритроцитов человека и лошади, исходно проинкубированных в среде, содержащей как 0,15 моль/л, так и 0,4 моль/л NaCl при 37 и 0°C. В этих условиях величины максимальной антигемолитической активности хлорпромазина достаточно высоки и находятся в диапазоне 38–83%. Несмотря на разный уровень исходного повреждения эритроцитов (перенесенных в 4,0 моль/л NaCl из 0,15 моль/л или 0,4 моль/л NaCl) и значений минимального гемолиза в присутствии хлорпромазина, эффективность вещества схожа для клеток человека и лошади при 37°C и отличается при 0°C. Для эритроцитов человека при 0°C антигемолитическая активность хлорпромазина в 1,2–1,4 раза выше.

**Ключевые слова:** эритроциты человека и лошади, гипертонический шок, частичное обезвоживание, температура, хлорпромазин.

UDC 536.352.462:612.111

### Temperature and Osmotic Sensitivity of Human and Equine Erythrocytes in Chlorpromazine Presence

**Shpakova N. M., Orlova N. V., Ershov S. S., Nipot O. E., Shapkina O. O.**

**Abstract.** The purpose of the work was to conduct a comparative analysis of the sensitivity of human and equine erythrocytes to hypertonic shock (4.0 mol/L NaCl) in conditions of the combined action of temperature, preliminary partial dehydration of cells and chlorpromazine.

**Material and methods.** Erythrocytes were obtained from donor blood by conventional methods. All media were prepared on 0.01 mol / l phosphate buffer, pH 7.4. Chlorpromazine from Calbiochem was used in the study. Hypertensive shock was performed as follows: using a Gilson piston dispenser, 50 µl of erythrocyte pellet was transferred into 0.5 ml of NaCl solution (0.15 mol / l or 0.4 mol / l) and incubated for 2 min at 37 or 0°C. (pre-incubation step). Then from each sample 50 µl of erythrocyte suspension was transferred into 1 ml of 4.0 mol / l NaCl (stage of hypertensive shock) containing chlorpromazine, at a constant temperature (37 or 0°C). The cells were then pelleted by centrifugation and the amount of hemoglobin in the supernatant was determined spectrophotometrically at a wavelength of 543 nm.

**Results and discussion.** The study results showed that the lowest level of hypertonic hemolysis of control human and equine erythrocytes (with no chlorpromazine) was observed with the combined use of preliminary incubation of cells in 0.4 mol/L NaCl and low temperature. In all the cases, the level of hypertonic hemolysis of the control equine cells was lower than that of human erythrocytes. This fact suggests that equine erythrocytes were more resistant to hypertonic shock. It is known that, unlike many mammal erythrocytes, the cells of horse are deprived of one of the components of the cytoskeletal complex, i.e. band 4.2 protein. This protein binds to the cytoplasmic domain of the band 3 protein and interacts with ankyrin in human erythrocytes. The compositional feature of the equine erythrocyte cytoskeleton-membrane complex is responsible for their higher resistance to the action of hypertonic shock if compared to human cells. The use of chlorpromazine reduced the level of hypertonic damage to human and equine erythrocytes, initially incubated in a medium containing both 0.15 mol/L and 0.4 mol/L NaCl at 37 and 0°C. Under these conditions, the values of the maximum anti-hemolytic activity of chlorpromazine are quite high and are in the range of 38-83%. Despite the different level of initial damage to erythrocytes (transferred to 4.0 mol/L NaCl from 0.15 mol/L or 0.4 mol/L NaCl) and the values of minimal hemolysis in the chlorpromazine presence, the effectiveness of the substance is similar for human and equine cells at 37°C and differs at 0°C. Under low temperature, the antihemolytic activity of chlorpromazine when using human cells was by 1.2-1.4 times higher.

**Conclusion.** The distribution of chlorpromazine molecules in plasma membrane of erythrocytes is heterogeneous. The plasma membranes of erythrocytes of various mammal species differ in lipid composition. Perhaps at 0°C, the sites of building-in of amphiphilic molecules into the membrane change due to the structural transition of certain lipids at 0°C and differ for human and horse erythrocytes that lead to various manifestations of the antihemolytic activity of the test substance at low temperature.

**Keywords:** human and equine erythrocytes, hypertonic shock, partial dehydration, temperature, chlorpromazine.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.*

Стаття надійшла 29.05.2020 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування