

УДК: 577.352.462:615.273.2

**Антигемолитическая активность хлорпромазина в условиях гипотонического лизиса эритроцитов в средах различного катионного состава**  
**К.В.Маркова<sup>1</sup>, О.А.Олейник<sup>2</sup>, Н.М.Шпакова<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

<sup>2</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)

Провели исследование гипотонического лизиса эритроцитов в средах, содержащих NaCl, KCl, LiCl. Показали, что гипотонический лизис эритроцитов начинается в Li<sup>+</sup>-содержащей среде при более высоких концентрациях соли, чем в Na<sup>+</sup>- и K<sup>+</sup>-содержащих средах. Кроме того, показали, что хлорпромазин хуже защищает эритроциты, предварительно проинкубированные 40 мин, от гипотонического повреждения по сравнению с эритроцитами, проинкубированными 20 мин. При этом антигемолитическая активность хлорпромазина наименьшая в Li<sup>+</sup>-содержащей среде.

Ключевые слова: *эритроциты, гипотонический лизис, хлорпромазин, катионы Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>.*

**Введение**

В настоящее время одной из актуальных проблем биологии является исследование механизмов повреждения и защиты клеток в условиях действия стрессовых факторов, которые в первую очередь влияют на плазматическую мембрану клетки. Особое место занимает при этом гипотонический гемолиз эритроцитов, который служит постоянным объектом фундаментальных и прикладных исследований. В настоящее время хорошо известно, что хлорпромазин (ХПР) защищает эритроциты от гипотонического повреждения в средах, содержащих NaCl (Hagerstrand, Isomaa, 1991). Однако, на сегодня нет четких данных о том, способен ли ХПР защищать эритроциты от повреждения в гипотонических средах, имеющих другой катионный состав. Поэтому целью данной работы было исследовать влияние ХПР на развитие гипотонического лизиса эритроцитов в средах, содержащих NaCl, KCl, LiCl.

**Объекты и методы исследования**

Эритроциты получали из свежеконсервированной донорской крови, заготовленной на глюцицировом консерванте. С целью унификации объекта в работе использовали кровь мужчин II группы. После удаления плазмы эритромассу трижды отмывали путем центрифугирования при 1500 g в течение 3 мин в 10-кратном объеме физиологического раствора (0,15 Моль/л NaCl, 0,01 Моль/л трис-буфер, pH 7,4). Лейкоцитарную пленку и супернатант удаляли методом аспирации. Эритроциты в виде плотного осадка хранили при 4°C и использовали в течение 4 часов.

В работе были использованы хлорпромазин гидрохлорид фирмы "Calbiochem", реактивы отечественного производства квалификации х.ч. и ч.д.а.

Гипотонический лизис эритроцитов осуществляли перенесением аликвот клеточной суспензии в гипотонические среды, содержащие NaCl, KCl, LiCl (конечный гематокрит 0,5%), при 37°C на 5 мин, после этого пробы центрифугировали и определяли содержание гемоглобина в надосадке спектрофотометрическим методом ( $\lambda=543$  нм). Выход гемоглобина из клеток рассчитывали в процентах по отношению к 100%-му гемолизу эритроцитов в присутствии тритона X-100 (0,1%).

Перед перенесением в гипотонические среды эритроциты (20% гематокрит) инкубировали в среде, содержащей 90 мМоль/л KCl, 45 Моль/л NaCl, 44 мМоль/л сахарозы, 10 мМоль/л триса (pH 7,4, 37°C) в течение 20 и 40 мин. После этого клетки отмывали дважды физиологическим раствором. ХПР использовали в его эффективной концентрации 80 мкМ (концентрация ХПР, при которой наблюдается минимальное значение гипотонического гемолиза эритроцитов) (Ершов и др., 2005). ХПР добавляли в гипотоническую среду перед внесением клеток.

Значение максимальной антигемолитической активности ( $AG_{max}$ ) ХПР рассчитывали по формуле:

$$AG_{max} = \frac{k-a}{k} \times 100\%$$

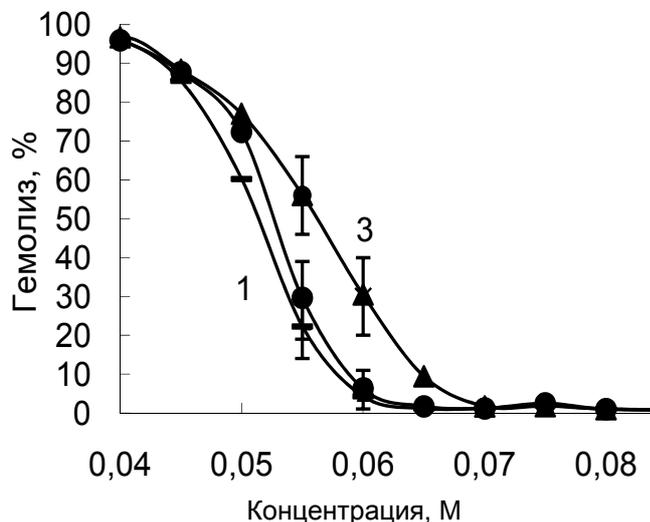
, где

k – величина гемолиза эритроцитов в отсутствие ХПР;

a – минимальная величина гемолиза эритроцитов в присутствии ХПР.

## Результаты

Было исследовано влияние катионного состава на процесс гипотонического лизиса эритроцитов в средах, содержащих NaCl, KCl, LiCl. На рис. 1 представлены кривые гипотонического гемолиза эритроцитов в средах с различным катионным составом.



**Рис. 1. Гипотонический гемолиз эритроцитов человека в средах, содержащих NaCl (1), KCl (2), LiCl (3) при 37°C**

Видно, что в интервале концентраций солей 0,07–0,09 М гемолиз практически отсутствует. Развитие лизиса клеток наблюдается в средах с концентрацией солей 0,065 М и выше, причём характер и начало его развития зависят от качественного состава гипотонической среды. Так, пороговая концентрация (концентрация, при которой уровень гемолиза эритроцитов составляет примерно 10%) для NaCl соответствует 0,058 М, KCl – 0,06 М, а для LiCl – 0,067 М, что свидетельствует о большей чувствительности эритроцитов к гипотонической Li<sup>+</sup>-содержащей среде. Кроме того, следует отметить, что кривые зависимости гемолиза от концентрации соли в средах, содержащих NaCl и KCl, имеют сходный характер, в то время как кривая гемолиза в Li<sup>+</sup>-содержащей среде существенно отличается. Кривая в Li<sup>+</sup>-содержащей среде имеет более пологий характер, что свидетельствует о меньшей синхронности гемолиза эритроцитов по сравнению с Na<sup>+</sup>- и K<sup>+</sup>-содержащими средами.

Известно, что гипотонический лизис может блокироваться различными соединениями, в том числе и ХПР, который защищает эритроциты от гипотонического гемолиза в средах, содержащих NaCl (Hagerstrand, Isomaa, 1991). Поэтому в нашей работе использовали ХПР во всех трёх исследуемых гипотонических средах для оценки влияния катионного состава среды на эффективность данного вещества. В работах (Ямайкина, Черницкий, 1991; Gershfeld, Mugaуama, 1988) было показано, что состояние эритроцитов зависит от продолжительности инкубации клеток при 37°C. Исходя из этого, мы изначально инкубировали эритроциты различное время при 37°C в среде предварительной инкубации (см. «Объекты и методы исследования»), а затем переносили в гипотоническую среду. В экспериментах использовались гипотонические среды, уровень повреждений эритроцитов в которых составлял 65–70 %.

На рис. 2 представлены данные о влиянии ХПР на уровень гипотонического лизиса эритроцитов в средах разного состава. Видно, что в среде, содержащей NaCl, предварительная инкубация клеток при 37°C как в течение 20, так и в течение 40 мин не оказывает влияния на уровень гипотонического гемолиза эритроцитов. В присутствии ХПР наблюдается снижение уровня гипотонического лизиса эритроцитов, причём при 20 мин изотонической инкубации гемолиз снижается в большей степени, чем при 40 мин прединкубации. Отмеченные особенности гипотонического гемолиза характерны и для двух других сред. Однако, следует отметить, что в Li<sup>+</sup>-содержащей среде ХПР не снижает уровень гипотонического лизиса клеток, которые предварительно инкубировались 40 мин.

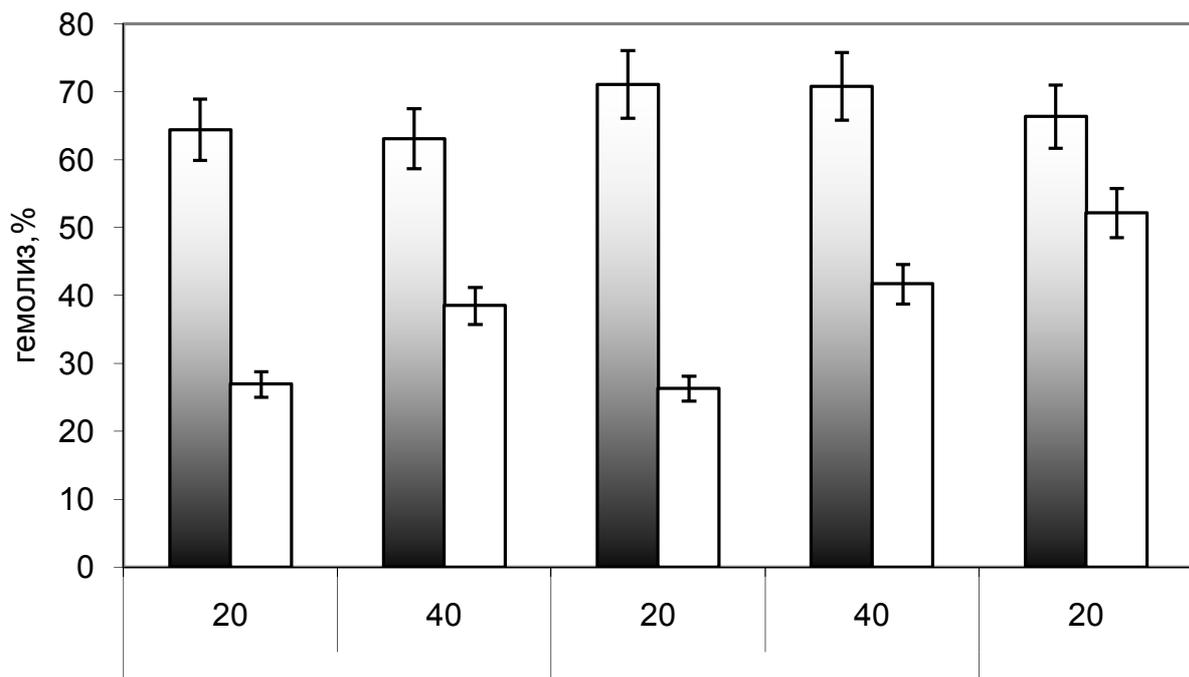


Рис. 2. Влияние продолжительности прединкубации и ХПР (80 мкМ) на гипотонический лизис эритроцитов в средах, содержащих NaCl, KCl, LiCl при 37°C

■ контроль,  
□ ХПР.

Для того чтобы оценить эффективность ХПР, были подсчитаны значения его максимальной антигемолитической активности в разных средах. Данные представлены в табл. 1.

Таблица 1.  
Значения максимальной антигемолитической активности ( $AG_{max}$ ) ХПР в условиях гипотонического стресса эритроцитов в различных средах при 37°C

Среда	$AG_{max}$ , %	
	20 мин	40 мин
NaCl	$59 \pm 11$	$41^* \pm 10$
KCl	$64 \pm 11$	$44^* \pm 11$
LiCl	$25^{**} \pm 9$	$8^{***} \pm 6$

\* –  $P < 0,05$  в сравнении с контролем, \*\* –  $P < 0,05$  в сравнении с 20 мин.

Видно, что во всех изучаемых средах эффективность ХПР в условиях гипотонического лизиса зависит от продолжительности инкубации клеток в изотонических условиях и достоверно ниже при длительной инкубации клеток (40 мин). ХПР проявляет высокую антигемолитическую активность при гипотоническом повреждении эритроцитов в средах, содержащих NaCl и KCl, причём достоверных отличий в этом случае не выявлено. В то же время антигемолитическая активность ХПР снижается более чем в 2 раза в  $Li^+$ -содержащей среде.

Таким образом, эффективность ХПР при гипотоническом лизисе эритроцитов в  $K^+$ - и  $Na^+$ -содержащих средах гораздо выше, чем в  $Li^+$ -содержащей среде, при этом его антигемолитическая активность зависит от продолжительности инкубации клеток на этапе, предшествующем гипотоническому стрессу. Таким образом, ХПР позволяет выявить отличия в состоянии эритроцитарной мембраны, обусловленные как различным катионным составом, так и различной продолжительностью инкубирования клеток при 37°C в изотонических условиях.

### Обсуждение

При помещении клеток в гипотонические условия наблюдается их набухание в результате поступления воды в клетку. Набухание клеток происходит до определённого предела – достижения клеткой критического гемолитического объёма, после чего наблюдается их лизис. Можно полагать, что в  $\text{Li}^+$ -содержащей среде клетки быстрее достигают критического гемолитического объёма, поэтому лизис наблюдается в средах, содержащих более высокие концентрации соли, по сравнению с  $\text{K}^+$ - и  $\text{Na}^+$ -содержащими средами. Так, авторы работы (Lieber, Steck, 1982) показали, что двухвалентные катионы снижают скорость образования поры. Одновалентные катионы различаются по своим физико-химическим свойствам. Так, катионы калия являются хаотропами, очень слабогидратированными ионами, в то время как катион натрия связывает 0,22 молекул воды, а лития – 0,58 молекул воды. Таким образом,  $\text{Li}^+$  является самым гидратированным в ряду  $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+$ . Здесь можно провести аналогию с результатами, которые показывают, что  $\text{Li}^+$ -содержащая среда оказывается наиболее неблагоприятной для клеток (Collins, 2006). Вероятно, что наблюдаемые особенности гипотонического повреждения эритроцитов в средах разного состава, а именно более выраженное повреждение клеток в  $\text{Li}^+$ -содержащей среде, может быть обусловлено физико-химическими особенностями данного катиона.

Известно, что ХПР протектирует эритроциты от повреждения при различных стрессовых воздействиях: при осмотических стрессах (гипотоническом (Hagerstrand, Isomaa, 1991), гипертоническом (Орлова, 2001; Шпакова, 1988; Шпакова и др., 1995), постгипертоническом (Нипот, 1997), холодом шоке (Орлова, 2001; Шпакова, 1988), а также лизисе клеток, вызванном действием порообразующих агентов (Rudenko, Nipot, 1996)). Молекулы ХПР, несущие положительный заряд, встраиваются во внутренний монослой мембраны, взаимодействуя с отрицательно заряженным фосфатидилсеринем (Eskelinen, Saukko, 1984). Существует точка зрения, что местами связывания ХПР в мембране могут быть и кислые полифосфоинозитидные липиды (Chen et al., 2003). Существует предположение (Miseta et al., 1995), что встраивание амфифилов в эритроцитарную мембрану инициирует быстрый выход ионов  $\text{K}^+$  в гипотоническую среду, что сглаживает различия в осмотическом давлении между клеткой и средой, препятствуя гемолизу эритроцитов. Часто предполагают (Seeman, 1966, 1972), что защитный эффект ХПР при гипотоническом лизисе связан с повышением значения критического гемолитического объёма при встраивании амфифила в мембрану. Однако это противоречит экспериментам, где было показано, что различные антигемолитические амфифилы могут уменьшать или не влиять на величину критического гемолитического объёма (Beresford, Fastier, 1980; Eskelinen, Saukko, 1984). Эти работы показывают, что увеличенный критический гемолитический объём при встраивании амфифилов в бислой не является главным механизмом, который объясняет амфифил-индуцированный антигемолиз.

Полученные нами данные позволяют говорить о зависимости проявления эффективности вещества от предыстории клетки. По-видимому, в мембране эритроцитов в изотонических условиях (при  $37^\circ\text{C}$ ) развиваются некие время-зависимые процессы, которые модифицируют встраивание молекул ХПР в мембрану эритроцитов, находящихся в гипотонической среде, в итоге приводящие к изменению эффективности вещества, особенно выраженное в  $\text{Li}^+$ -содержащей среде. Основываясь на полученных нами данных при 20, 40 мин инкубации при  $37^\circ\text{C}$ , можно говорить о зависимости проявления эффективности вещества от предыстории клетки.

Таким образом, проявление антигемолитической активности хлорпромазина зависит от времени инкубации клеток в физиологической среде и катионного состава гипотонической среды. Применение ХПР может являться тестом на состояние эритроцитарной мембраны.

### Список литературы

- Ершов С.С., Нипот Е.Е., Зуева В.Н. Сравнительный анализ чувствительности эритроцитов млекопитающих к изменению осмотических условий среды // 9-я международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино, 2005. – С. 161–162
- Нипот О.Є. Вивчення механізмів пошкодження еритроцитів при дегідратації–регідратації і дії деяких літичних пептидів. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Харків, 1997. – 24с.
- Орлова Н.В. Вплив амфіфільних сполук на осмотичну і температурну чутливість еритроцитів. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Харків, 2001. – 18с.
- Шпакова Н.М. Действие криопротекторов и амфипатических соединений на состояние эритроцитов, подвергнутых холодному и осмотическому шоку. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1988. – 16с.
- Шпакова Н.М., Панталер Е.Р., Бондаренко В.А. Антигемолитический эффект хлорпромазина при гиперосмотическом и холодом шоке эритроцитов // Биохимия. – 1995. – Т.60, №10. – С. 1624–1631.
- Ямайкина И.В., Черницкий Е.А. Термогемолиз эритроцитов в диапазоне температур, включающих физиологические (аутогемолиз) // Биофизика. – 1991. – Т.34, №4. – Р. 656–659.

- Beresford R.A., Fastier F.N. Effects of some S-alkylthiuroniums and related compounds on the osmotic fragility and the membrane expansion of human erythrocyte // Br. J. Pharmacol. – 1980. – Vol.71. – P. 253–258.
- Chen J.Y., Brunauer L.S., Chu F.C. et al. Selective amphipathic nature of chlorpromazine binding to plasma membrane bilayers // Biochim. Biophys. Acta. – 2003. – Vol.1616, №1. – P. 95–105.
- Collins K.D. Ion hydration: implications for cellular function, polyelectrolytes and protein crystallization // Biophysical chemistry. – 2006. – Vol.119. – P. 271–281.
- Eskelinen S., Saukko P. The hypotonic hemolysis and the protective action of lysophosphatidylcholine // Biorheology. – 1984. – Vol.21. – P. 363–377.
- Gershfeld N.L., Murayama M. Thermal instability of red blood cell membrane bilayers: temperature dependence of hemolysis // J. Membr. Biol. – 1988. – Vol.101, №1. – P. 67–72.
- Hagerstrand H., Isomaa B. Amphiphile-induced antihaemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation // Chem.-Biol. Inter. – 1991. – Vol.79. – P. 335–347.
- Lieber M.R., Steck T.L. Dynamics of the holes in human erythrocyte membrane ghosts // Journal of biological chemistry. – 1982. – Vol.257. – P. 11660–11666.
- Miseta A., Bogner P., Szarka A. et al. Effect of non-lytic concentrations of Brij series detergents on the metabolism-independent ion permeability properties of human erythrocytes // Biophysical journal. – 1995. – Vol.69. – P. 2563–2568.
- Rudenko S.V., Nipot E.E. Protection by chlorpromazine, albumin and bivalent cations against haemolysis induced by melittin [Ala-14] melittin and whole bee venom // Biochem. J. – 1996. – Vol.317. – P. 747–754.
- Seeman P.A. A method for distinguishing specific from nonspecific hemolysis // Biochem. Pharmacol. – 1966. – Vol.15. – P. 1767–1774.
- Seeman P. The membrane actions of anaesthetics and tranquilizers // Pharmacol. Rev. – 1972. – Vol.24. – P. 583–655.

**Антигемолітична активність хлорпромазину в умовах гіпотонічного лізису еритроцитів в середовищах різного катіонного складу**  
**К.В.Маркова, О.А.Олійник, Н.М.Шпакова**

Провели дослідження гіпотонічного лізису еритроцитів в середовищах, що містять NaCl, KCl, LiCl. Показали, що гіпотонічний лізис еритроцитів починає розвиватися в середовищі, що містить  $\text{Li}^+$ , при вищих концентраціях солі, ніж в середовищах, які містять  $\text{Na}^+$  і  $\text{K}^+$ . Крім того, показали, що хлорпромазин гірше захищає еритроцити, заздалегідь проінкубовані 40 хв., від гіпотонічного пошкодження в порівнянні з еритроцитами, які були проінкубовані 20 хв. При цьому антигемолітична активність хлорпромазину найменша в середовищі, що містить  $\text{Li}^+$ .

Ключові слова: *еритроцити, гіпотонічний лізис, хлорпромазин, катіони  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ .*

**Antihemolytic activity of chlorpromazine in the conditions of hypotonic lysis of erythrocytes in the mediums of different cationic composition**  
**K.V.Markova, O.A.Oleinyk, N.M.Shpakova**

The hypotonic lysis of erythrocytes in mediums containing NaCl, KCl, LiCl has been studied. It has been shown that the hypotonic lysis of erythrocytes began to develop in  $\text{Li}^+$ -containing medium at more high concentrations of salt on comparison to  $\text{Na}^+$ - and  $\text{K}^+$ -containing mediums. In addition, it has been shown that a chlorpromazine worse protected erythrocytes preliminary incubated 40 min from the hypotonic damage as compared to erythrocytes preliminary incubated 20 min. Besides antihemolytic activity of chlorpromazine is the least in  $\text{Li}^+$ -containing medium.

Key words: *erythrocytes, hypotonic lysis, chlorpromazine, cations  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ .*

Представлено Г.Ф.Жегуновим  
 Рекомендовано до друку В.А.Бондаренком