

УДК: 612.118.221.3:541.183

**Антигемолитическая активность амфифильных соединений в условиях гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих, модифицированных фенилгидразином**  
Н.А.Писаренко<sup>1</sup>, Н.М.Шпакова<sup>2</sup>, Н.В.Орлова<sup>2</sup>

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

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

Было изучено влияние фенилгидразина на уровень гемолиза эритроцитов человека, лошади, быка и кролика, а также на способность амфифильных веществ протектировать клетки от повреждения в условиях гипертонического криогемолиза. Обнаружено, что обработка эритроцитов млекопитающих фенилгидразином изменяет их чувствительность к гипертоническому криогемолизу, при этом чувствительность эритроцитов человека и лошади к стрессовому воздействию снижается, а эритроцитов быка и кролика – повышается. Выявлено снижение антигемолитической активности амфифильных соединений в условиях гипертонического криогемолиза эритроцитов человека, лошади и быка, модифицированных фенилгидразином.

**Ключевые слова:** гипертонический криогемоллиз, амфифильные соединения, фенилгидразин, эритроциты млекопитающих.

**Антигемолітична активність амфифільних сполук в умовах гіпертонічного криогемолізу еритроцитів ссавців, модифікованих фенілгідразином**  
Н.А.Писаренко, Н.М.Шпакова, Н.В.Орлова

Було вивчено вплив фенілгідразину на рівень гемолізу еритроцитів людини, коня, бика і кролика, а також на здатність амфифільних речовин протектувати клітини від пошкодження в умовах гіпертонічного криогемолізу. Виявлено, що обробка еритроцитів ссавців фенілгідразином змінює їх чутливість до гіпертонічного криогемолізу, при цьому чутливість еритроцитів людини і коня до стресової дії знижується, а еритроцитів бика і кролика – підвищується. Виявлено зниження антигемолітичної активності амфифільних сполук в умовах гіпертонічного криогемолізу еритроцитів людини, коня і бика, модифікованих фенілгідразином.

**Ключові слова:** гіпертонічний криогемоліз, амфифільні сполуки, фенілгідразин, еритроцити ссавців.

**Antihaemolytic activity of amphiphilic compounds under conditions of hypertonic cryohemolysis of phenylhydrazine-modified mammalian red blood cells**

N.A.Pisarenko, N.M.Shpakova, N.V.Orlova

The effect of phenylhydrazine on the level of hemolysis of human, equine, bovine and rabbit red blood cells as well as the ability of amphiphilic compounds to protect the cells from damage under hypertonic hemolysis has been studied. It has been revealed that treatment of mammalian red blood cells with phenylhydrazine changes their sensitivity to hypertonic cryohemolysis, herewith the sensitivity of human and equine red blood cells to stress effect reduces and those of bovine and rabbit increase. There was found the reduction of antihemolytic activity of amphiphilic compounds under conditions of hypertonic cryohemolysis of human, equine and bovine red blood cells, modified with phenylhydrazine.

**Key words:** hypertonic cryohemolysis, amphiphilic compounds, phenylhydrazine, mammalian red blood cells.

**Введение**

Охлаждение эритроцитов от 37 до 0°C в гипертонических средах называют гипертоническим криогемолизом, который является моделью повреждения клеток при замораживании. Уровень повреждения эритроцитов различных видов животных при охлаждении в гипертонических условиях можно снизить при помощи амфифильных соединений (Шпакова та ін., 2007; Ершов та ін., 2007).

Одним из важных структурных элементов, обеспечивающих стабильность или нестабильность клетки при охлаждении в гипертонических условиях (Белоус, Бондаренко, 1982; Green et al., 1981) и при криоконсервировании (Гулевский и др., 1988), является система мембранных цитоскелетных белков (Белоус и др., 1990; Белоус, 1990). Обработка эритроцитов человека фенилгидразином приводит к модификации цитоскелет-мембранного комплекса, в частности к деградации обоих мономеров спектрина (Arduini et al., 1989). Представляло интерес исследовать эффективность

амфифильных соединений при гипертоническом криогемоллизе эритроцитов, модифицированных фенилгидразином.

**Цель работы:** изучить влияние фенилгидразина на гипертонический криогемоллиз эритроцитов различных видов млекопитающих (человек, лошадь, бык, кролик) и на антигемолитическую активность амфифильных соединений.

#### Объекты и методы исследования

Для исследования использовали эритроциты, полученные из цельной крови млекопитающих, заготовленной на глюцицированом консерванте.

Гипертонический криогемоллиз эритроцитов проводили путем помещения эритроцитов в раствор NaCl, 1,2 моль/л, при температуре 37°C на 10 мин, с последующим перенесением аликвоты в раствор той же тоничности, охлажденный до 0°C, на 10 мин. Конечный гематокрит составлял 0,4%. Амфифильные соединения в эффективной концентрации добавляли в гипертоническую среду, имеющую температуру 0°C, перед внесением в нее клеток (Шпакова и др., 1995). За эффективную концентрацию амфифильного соединения принимали концентрацию, при которой наблюдался минимальный лизис клеток.

Модификацию цитоскелета эритроцитов фенилгидразином осуществляли по методу (Arduini et al., 1989). Клетки в условиях постоянного перемешивания (гематокрит 5%) инкубировали в физиологическом растворе (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатный буфер, pH 7,4), содержащем фенилгидразин (1 ммоль/л), при температуре 37°C в течение 10 мин. Затем эритроциты дважды отмывали физиологическим раствором и использовали в последующей работе.

Количество вышедшего в супернатант гемоглобина определяли спектрофотометрически при длине волны 543 нм. За 100% принимали поглощение пробы, в которую добавляли детергент тритон X-100 в концентрации 0,1%.

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

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

где  $k$  – величина гемоллиза эритроцитов при отсутствии амфифильного вещества;  $a$  – минимальная величина гемоллиза эритроцитов в присутствии амфифильного вещества.

В работе были использованы следующие вещества: децилсульфат натрия и додецилсульфат натрия (СинтезПАВ), додецил- $\beta$ ,D-мальтозид (Calbiochem), трифторперазин (Sigma), фенилгидразин (Sigma) и реактивы отечественного производства квалификации «хч» и «чда». Статистическую обработку результатов проводили с помощью Манна-Уитни и ANOVA тестов [StatgraphWin]. Расхождения между группами считали статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

#### Результаты и обсуждение

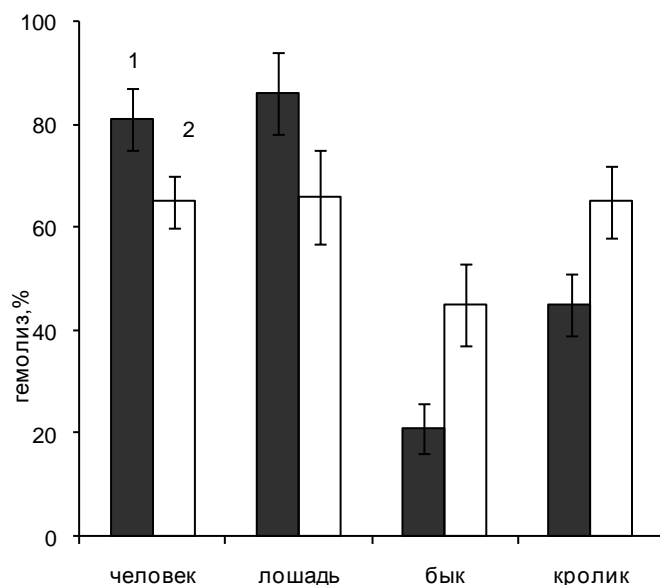
Гипертонический криогемоллиз (ГК) представляет собой явление повреждения эритроцитов при их быстром охлаждении в гипертонических средах. В качестве гипертонической среды был выбран раствор, содержащий 1,2 моль/л NaCl, т.к. в данной среде достигается максимальный уровень повреждения эритроцитов человека при ГК (Гордиенко, Коваленко, 1997).

Видно (рис. 1), что исходный уровень повреждения эритроцитов исследуемых видов млекопитающих в значительной степени различается. Так, уровень лизиса эритроцитов человека и лошади при охлаждении в 1,2 моль/л NaCl составляет более 80%, повреждение эритроцитов кролика несколько ниже (45%), в то время как эритроциты быка достаточно устойчивы в данных стрессовых условиях, уровень гемоллиза клеток составляет всего 20%.

При обработке клеток фенилгидразином их чувствительность к гипертоническому криогемоллизу зависит от видовой принадлежности клеток. Так, чувствительность эритроцитов человека и лошади к охлаждению в гипертонических условиях уменьшается, а быка и кролика – повышается.

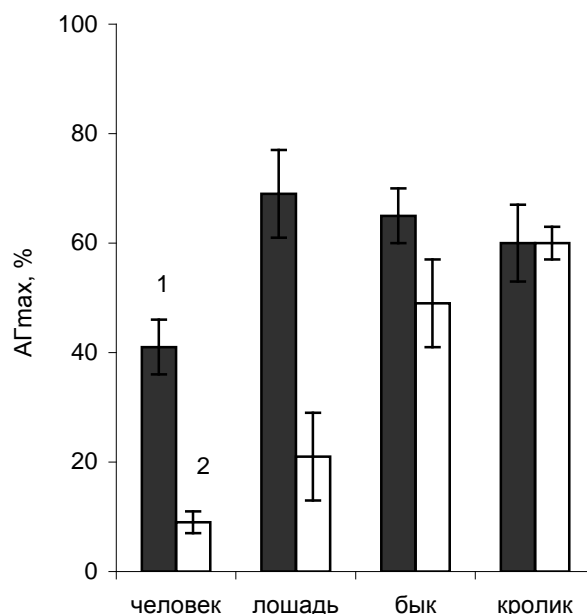
Ранее было показано, что амфифильные соединения позволяют повысить устойчивость эритроцитов человека и животных к изменению осмотических и температурных параметров среды (Hagerstrand, Isomaa, 1991; Ершов та ін., 2007; Писаренко и др., 2007; Шпакова та ін., 2007).

В данной работе мы использовали амфифильные соединения, относящиеся к различным классам: децил- и додецилсульфат натрия (C10 и C12) – к анионным, трифторперазин (ТФП) – к катионным, додецил- $\beta$ ,D-мальтозид (ДМ) – к неионным.



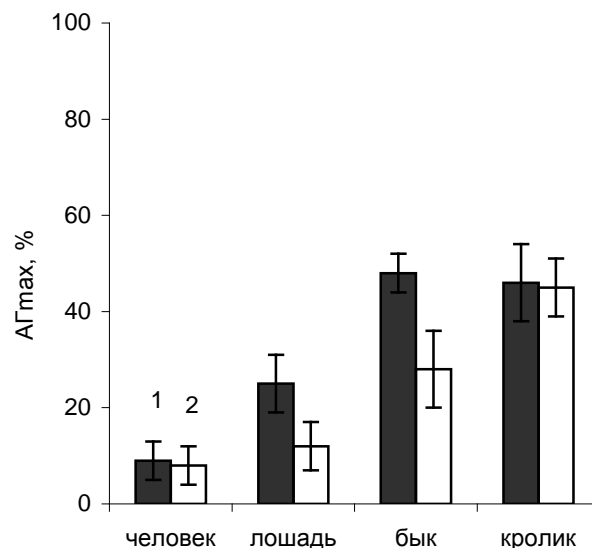
**Рис. 1. Влияние фенилгидразина на чувствительность эритроцитов млекопитающих к гипертоническому криогемолизу в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl: 1 – нативные эритроциты; 2 – эритроциты, модифицированные фенилгидразином**

На рис. 2 представлены значения максимальной антигемолитической активности С10 при гипертоническом криогемоллизе нативных и модифицированных фенилгидразином эритроцитов млекопитающих. Видно, что данное соединение проявляет значительный защитный эффект в условиях гипертонического криогемоллиза эритроцитов всех исследуемых видов млекопитающих. Следует отметить, что антигемолитическая активность С10 в отношении эритроцитов животных выше (60–70 %), чем для клеток человека (41%). Предобработка эритроцитов млекопитающих фенилгидразином приводит к снижению способности С10 протектировать клетки млекопитающих при охлаждении в гипертонических условиях, за исключением эритроцитов кролика. Антигемолитическая активность С10 для эритроцитов человека и лошади падает более чем в 3–4 раза, для эритроцитов быка – в 1,3 раза, в то время как в случае эритроцитов кролика эффективность данного соединения остается на уровне контроля.



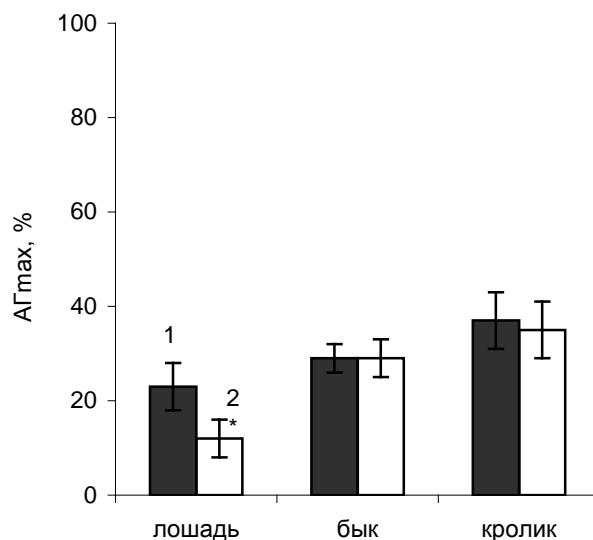
**Рис. 2. Максимальная антигемолитическая активность децилсульфата натрия (С10) в условиях гипертонического криогемоллиза нативных (1) и модифицированных фенилгидразином (2) эритроцитов млекопитающих в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl**

Другой анионный амфифил, С12, имеющий более длинную алкильную цепь, проявляет менее выраженный антигемолитический эффект по сравнению с С10 (рис. 3). С12, также как и С10, обладает минимальным защитным действием в отношении эритроцитов человека. После модификации эритроцитов млекопитающих фенолгидразином наблюдается снижение эффективности действия С12 в случае эритроцитов лошади и быка, в то время как для эритроцитов человека и кролика антигемолитическая активность данного соединения не изменяется. Таким образом, в условиях гипертонического криогемоліза модифицированных эритроцитов млекопитающих анионные амфифильные соединения (С10 и С12) наиболее эффективны для эритроцитов кролика.



**Рис. 3.** Максимальная антигемолитическая активность додецилсульфата натрия (С12) в условиях гипертонического криогемоліза нативных (1) и модифицированных фенолгидразином (2) эритроцитов млекопитающих в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl

Неионный ДМ обладает антигемолитической активностью в отношении эритроцитов животных, но не эффективен для эритроцитов человека (рис. 4). Антигемолитическая активность данного соединения колеблется в пределах 20–40%. Модификация эритроцитов млекопитающих фенолгидразином приводит к достоверному снижению антигемолитической активности ДМ только в случае эритроцитов лошади, тогда как для эритроцитов быка и кролика отличий не выявлено.

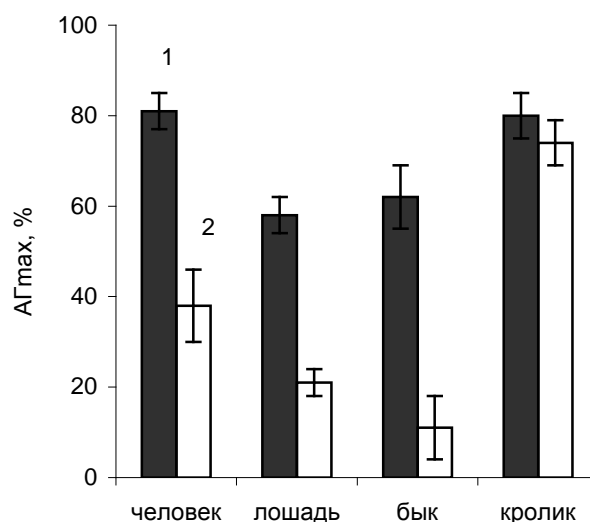


**Рис. 4.** Максимальная антигемолитическая активность додецил- $\beta$ ,D-мальтозида (ДМ) в условиях гипертонического криогемоліза нативных (1) и модифицированных фенолгидразином (2) эритроцитов млекопитающих в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl (\* достоверно при  $p < 0,05$ )

На рис. 5 представлены значения максимальной антигемолитической активности трифторперазина (ТФП) при гипертоническом криогемолизе нативных и модифицированных фенолгидразином эритроцитов млекопитающих. Из представленных данных видно, что ТФП обладает значительным защитным действием в отношении всех исследуемых объектов при охлаждении клеток от 37 до 0°C в гипертонической среде. В данных экспериментальных условиях ТФП проявляет наибольшую эффективность в отношении эритроцитов человека и кролика (80%) и несколько меньшую для клеток быка и лошади (около 60%). Модификация эритроцитов млекопитающих фенолгидразином приводит к снижению эффективности ТФП в условиях гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих, за исключением клеток кролика. Так, антигемолитическая активность данного соединения в отношении модифицированных эритроцитов человека и лошади падает в 2–2,5 раза, а для эритроцитов быка – более чем в 5 раз. В случае эритроцитов кролика антигемолитическая активность ТФП по отношению к модифицированным клеткам не изменяется, что характерно для всех исследуемых соединений (рис. 2–5).

Явление гипертонического криогемолиза связывают с развитием трансмембранных микродефектов в мембране эритроцитов, появляющихся на этапе инкубации клеток в гипертонической среде при температуре 37°C, которые на этапе охлаждения увеличиваются до размера гемолитических пор. Реакция клеток на охлаждение в гипертонических условиях в значительной степени определяется состоянием цитоскелет-мембранного комплекса.

Известно, что экспозиция эритроцитов человека в растворе фенолгидразина приводит к деградации, в первую очередь, основного цитоскелетного белка спектрина, что проявляется в разрушении его  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей (62,3% и 48,5% соответственно). Отмеченный процесс характеризуется потерей спектрина без сопутствующего формирования высокомолекулярных продуктов (Arduini, Stern, 1985; Arduini et al., 1989). Согласно литературным данным, обработка эритроцитов фенолгидразином сопровождается увеличением ассоциации цитозольных белков, в первую очередь гемоглобина, с мембраной и цитоскелетом (Yamamoto et al., 1989; McMillan et al., 2005) и заметным уменьшением общих свободных сульфгидрильных групп большей части полипептидов в белых телях эритроцитов человека (Hashmi, Saleemuddin, 1996). Кроме того, фенолгидразин снижает текучесть липидной компоненты мембраны (Ogiso et al., 1989; Arduini et al., 1986).



**Рис. 5. Максимальная антигемолитическая активность трифторперазина (ТФП) в условиях гипертонического криогемолиза нативных (1) и модифицированных фенолгидразином (2) эритроцитов млекопитающих в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl**

Выявленное разнонаправленное изменение устойчивости исследуемых эритроцитов к гипертоническому криогемолизу после обработки фенолгидразином можно объяснить различиями в белковом и фосфолипидном составе исследуемых эритроцитов. В частности, содержание в мембранах эритроцитов быка и кролика таких фосфолипидов, как ФЭА и ФИ, выше, чем у человека и лошади (Wessels, Veerkamp, 1973; Nouri-Sorkhabi et al., 1996). Это, в свою очередь, может определять плотность упаковки мембранных липидов и текучесть мембраны. Кроме того, в работе (Matei et al., 2000) показано наличие двух субполос белка полосы 4.1 в эритроцитах быка и кролика в отличие от клеток человека и лошади.

Наблюдаемый защитный эффект амфифильных соединений в условиях гипертонического криогемоліза эритроцитов млекопитающих связывают со способностью данных веществ оказывать ярко выраженный пертурбирующий эффект на мембрану, тем самым препятствуя образованию трансмембранных пор (Шпакова и др., 1995). Уменьшение антигемолитической активности веществ в результате модификации эритроцитов человека, лошади и быка фенилгидразином, по-видимому, обусловлена тем, что при более плотной упаковке компонентов мембраны амфифильным соединениям сложнее встроиться и пертурбировать ее, что в результате и приводит к снижению их эффективности.

Высокая протектирующая способность веществ в отношении эритроцитов кролика даже в условиях модификации клеток фенилгидразином, возможно, связана с особенностями состава цитоскелет-мембранного комплекса эритроцитов этого вида (в частности, у кролика самое высокое отношение свободного холестерина к фосфолипидам (Garnier et al., 1984)). В данном случае модификация, по всей видимости, хоть и затрагивает цитоскелет, но не отражается на участках мембраны, которые являются мишенью (местом действия) для амфифилов.

### Выводы

1. Модификация эритроцитов млекопитающих фенилгидразином изменяет их чувствительность к гипертоническому криогемолізу, при этом чувствительность эритроцитов человека и лошади уменьшается, а эритроцитов быка и кролика возрастает.

2. Антигемолитическая активность амфифильных соединений в условиях гипертонического криогемоліза эритроцитов, модифицированных фенилгидразином, уменьшается для клеток всех исследуемых видов, за исключением эритроцитов кролика.

3. Максимальной антигемолитической активностью в отношении эритроцитов человека и кролика, модифицированных фенилгидразином, обладает ТФП, для эритроцитов быка – С10. В случае же модифицированных эритроцитов лошади все амфифилы проявляют незначительную эффективность в пределах 10–20 %.

### Список литературы

- Белоус А.М. Роль белков цитоскелета в холодовой стабильности клеток // Криобиология. – 1990. – №3. – С. 3–12.
- Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. – Киев: Наук. думка, 1982. – 255с.
- Белоус А.М., Гулевский А.К., Бабийчук Л.А. и др. Роль белков цитоскелета в изменении стабильности клеток при температурно-осмотическом воздействии // Криобиология. – 1990. – №4. – С. 3–13.
- Гордиенко Е.А., Коваленко С.Е. Основные закономерности явления гипертонического криогемоліза // Пробл. криобиол. – 1997. – №3. – С. 3–7.
- Гулевский А.К., Бондаренко В.А., Белоус А.М. Барьерные свойства биомембран при низких температурах. – Киев: Наук. думка, 1988. – 206с.
- Єршов С.С., Писаренко Н.А., Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Вплив катіонних та аніонних амфифільних сполук на гіпертонічний криогемолізі еритроцитів ссавців // Фізіол. журн. – 2007. – Т.53, №6. – С. 78–84.
- Писаренко Н.А. Шпакова Н.М., Орлова Н.В. Влияние амфифильных соединений на гипертонический стресс эритроцитов человека и быка // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2007. – Вып.5, №768. – С. 145–149.
- Шпакова Н.М., Панталер Е.Р., Бондаренко В.А. Антигемолитический эффект хлорпромазина при гиперосмотическом и холодовом шоке эритроцитов // Биохимия. – 1995. – Т.60, №10. – С. 1624–1631.
- Шпакова Н.М., Писаренко Н.А., Орлова Н.В., Хмельков В.М. Корекція гіпертонічного криогемолізу еритроцитів людини і бика за допомогою аніонних амфифільних сполук // Біологія тварин. – 2007. – Т.9, №1–2. – С. 146–151.
- Arduini A., Chen Z., Stern A. Phenylhydrazine-induced changes in erythrocyte membrane surface lipid packing // Biochim. Biophys. Acta. – 1986. – Vol.862, №1. – P. 65–71.
- Arduini A., Stern A. Spectrin degradation in intact red blood cells by phenylhydrazine // Biochem. Pharmacol. – 1985. – Vol.34, №24. – P. 4283–4289.
- Arduini A., Storto S., Belfiglio M. et al. Mechanism of spectrin degradation induced by phenylhydrazine in intact human erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta. – 1989. – Vol.979, №1. – P. 1–6.
- Garnier M., de Pilardeau G., Boudia D. Relationship between the intra-erythrocyte sodium composition and the membrane lipoprotein composition among different mammal species // Comp. Biochem. Physiol. – 1984. – Vol.77A, №2. – P. 315–317.
- Green F.A., Jung C.Y., Cupoletti J., Owens N. Hypertonic crioheolysis and the cytoskeletal system // Biochim. Biophys. Acta. – 1981. – Vol.648, №2. – P. 225–230.



- Hagerstrand H., Isomaa B. Amphiphile-induced antihemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation // *Chem.-Biol. Inter.* – 1991. – Vol.79. – P. 335–347.
- Hashmi A.N., Saleemuddin M. Phenylhydrazine causes sulfhydryl oxidation and protein aggregation in hemoglobin-free human erythrocyte membranes // *Biochem. Mol. Biol. Int.* – 1996. – Vol.40, №3. – P. 543–550.
- 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. – Vol.4, №4. – P. 270–276.
- McMillan D.C., Powell C.L., Bowman Z.S. et al. Lipids versus proteins as major targets of pro-oxidant, direct-acting hemolytic agents // *Toxicol. Sci.* – 2005. – Vol.88, №1. – P. 274–283.
- Nouri-Sorkhabi M.H., Agar N.S., Sullivan D.R. et al. Phospholipid composition of erythrocyte membranes and plasma of mammalian blood including Australian marsupials; quantitative <sup>31</sup>P NMR analysis using detergent // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1996. – Vol.113B, №2. – P. 221–227.
- Ogiso T., Ito Y., Iwaki M. et al. Effect of phenylhydrazine-induced structural alterations of human erythrocytes on basic drug penetration // *Chem. Pharm. Bull (Tokio)*. – 1989. – Vol.37, №2. – P. 430–434.
- 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. – Vol.291. – P. 190–196.
- Yamamoto K., Yamada M., Kato Y. Age-related and phenylhydrazine-induced activation of the membrane-associated cathepsin E in human erythrocytes // *J. Biochem.* – 1989. – Vol.105, №1. – P.114–119.

---

**Представлено: Г.Ф.Жегуновим**  
**Рекомендовано до друку: Є.Е.Перським**

© Н.А.Писаренко, Н.М.Шпакова, Н.В.Орлова, 2009