УДК 612.111:577.1:57083.332

К.В. Маркова, В.В. Рамазанов, В.А.Бондаренко**

АНТИГЕМОЛИТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ХПР НА ЭРИТРОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЕТЕРГЕНТНОМ ЛИЗИСЕ

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина (г. Харьков)

***Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)**

Работа выполнена соответственно научному направлению работы отдела криофизиологии клетки ИПКиК НАН Украины по теме: «Механизмы изменения осмотической и температурной чувствительности клеток при действии модификаторов цитоскелет-мембранного комплекса, амфифильных соединений и криопротекторов» (№ гос. регистрации 0104U006437).

Вступление. 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. Одним из методов изучения мембраны является исследование структурных изменений под воздействием различных модификаторов и детергентов. Известно, что при лизисе эритроцитов вызванном детергентами происходит разрушение липидного бислоя мембраны [4]. Установлено существенное различия в действии на мембрану ионных и неионных детергентов. Согласно многочисленным данным амфифильное соединение ХПР защищает эритроциты от гипотонического повреждения [16], гипертонического и температурного шока [13]. Однако, нет данных о том, способен ли ХПР защищать эритроциты от повреждения, вызванного воздействием детергентов.

В связи с этим **целью исследования** явилось изучение влияния ХПР на детергентный лизис эритроцитов человека с ионными детергентами ЦТАБ и ДСН и неионным Твин-20.

Объект и методы исследования. Исследовали эритроциты из свежеконсервированной донорской крови человека, которая была получена на областной станции переливания крови г. Харькова (заготовлена на глюгицировом консерванте). С целью унификации объекта, в работе использовали кровь мужчин II-ой группы. После удаления плазмы эритромассу трижды отмывали путем центрифугирования при 3000 об\мин 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°С и использовали в течение 2 часов. В работе использовали NaCl (х.ч.), сахарозу (ч.д.а.). Детергенты: ЦТАБ (цетилтриметиламмонийбромид, Sigma); ДСН (додецилсульфат натрия, Sigma); Твин-20 (полиоксиэтиленсорбитан монолаурат, Ferak).

Концентрация детергентов была предварительно подобрана и составляла для ЦТАБ - 26 мкМ/л, Твин-20 - 30мкМ/л, ДСН - 85мкМ/л. Гематокрит эритроцитов в экспериментальных средах составлял 0,35% с объёмом суспензии 1мл. Воздействие детергентов проводили при температуре 22±1°С в течение 10 минут. Все используемые в работе среды, в которых проводился детергентный лизис эритроцитов, готовили на 10мМ Трис-буфере, pH7,4. В работе был использован хлорпромазин гидрохлорид (ХПР) фирмы "Calbiochem". ХПР добавляли в среду перед внесением клеток в его эффективной концентрации 100 мкМ [5].

Значение максимальной антигемолитической активности (АГmax) ХПР рассчитывали по формуле:

$$АГ_{max} = \frac{к - а}{к} \times 100\,\%\text{, где}$$

к - величина гемолиза эритроцитов в отсутствие ХПР;

а - минимальная величина гемолиза эритроцитов в присутствии ХПР.

Процент гемолиза эритроцитов определяли по содержанию гемоглобина в надосадочной жидкости спектрофотометрическим методом (λ=543 нм). Выход гемоглобина из клеток рассчитывали в процентах по отношению к 100%-му гемолизу эритроцитов в присутствии тритона Х-100 (0,1%). Использовали формулу: $[A_1/A_2]\times100$ где A_1-оптическая плотность надосадочной жидкости экспериментального образца; A_2-оптическая плотность при полном гемолизе экспериментального образца. Статистический анализ результатов

проводили, используя критерий Вилкоксона-Мана-Уитни.

Результаты исследований и их обсуждение. В работе исследовали детергентный лизис эритроцитов человека в средах, содержащих NaCl и сахарозу, в присутствии амфифильного соединения ХПР. На **рис.1-3** представлены кривые гемолиза эритроцитов человека, под воздействием детергентов в присутствии ХПР.

Анализируя гемолиз эритроцитов под действием ЦТАБ **(рис.1)** можно заметить, что наименьший процент гемолиза эритроцитов наблюдается в среде содержащей 0,5М сахарозу, 0,15М NaCl 20мМ Трис (pH 7,4). Минимальный процент гемолиза в этой среде наблюдается и при обработке клеток другими детергентами **(рис. 2,3).** Это указывает на то, что при гипертоническом воздействии мембраны эритроцитов становятся устойчивыми к детергентам, вероятно из-за усиления гидрофобных взаимодействий в мембранах.

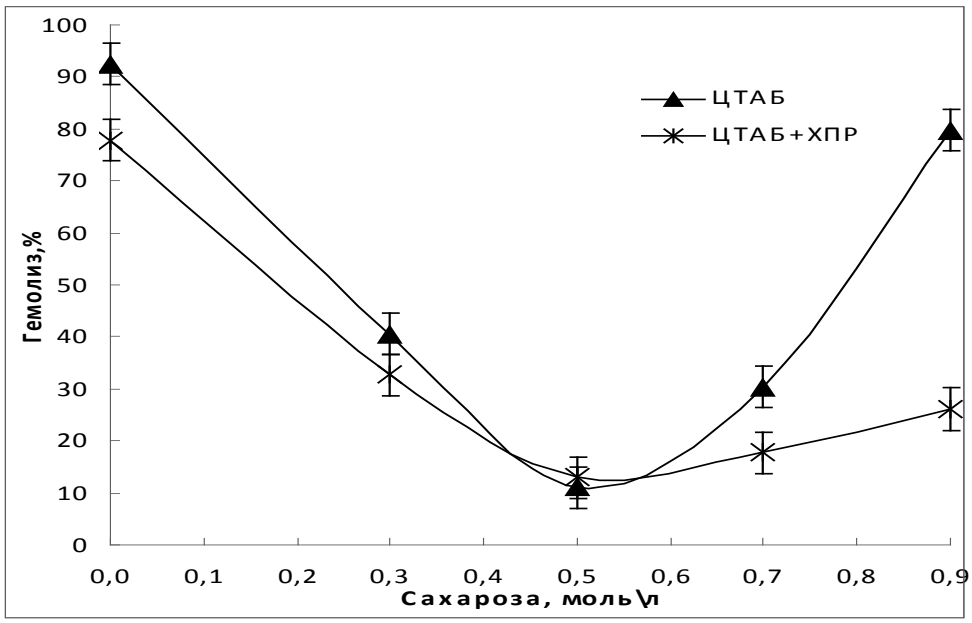

Рис.1. Влияние различных концентраций сахарозы на гемолиз эритроцитов человека под воздействием ЦТАБ (26 мкМ\л).
▲ – ЦТАБ, * - ЦТАБ+ХПР.

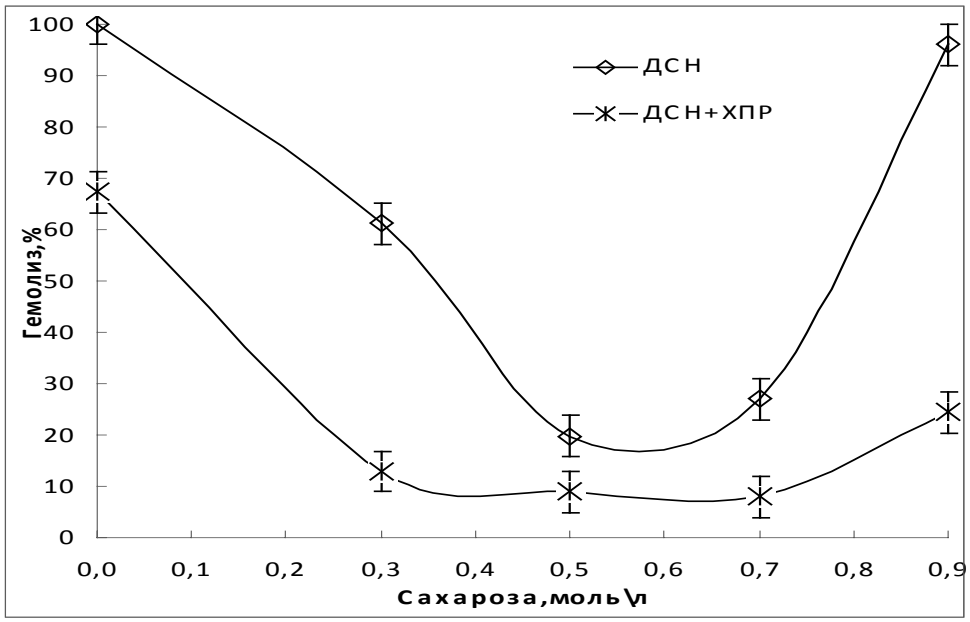

Рис.2. Влияние различных концентраций сахарозы на гемолиз эритроцитов человека под воздействием ДСН (85 мкМ\л).
◊ - ДСН, * - ДСН+ХПР.

В экспериментах с Твин-20 уровень гемолиза в среде 0,5М сахароза, 0,15М NaCl выше, чем при использовании ЦТАБ и ДСН. В экспериментах с ЦТАБ уровень гемолиза в данной среде ниже, чем при использовании ДСН. Из представленных результатов также видно, что амфифил ХПР способен оказывать антигемолитическое действие на эритроциты, для всех использованных детергентов. Причем ХПР не изменяет характера гемолиза, а лишь снижает процент гемолиза во всех средах. Более выраженное защитное действие ХПР проявляется в эксперименте с ДСН **(рис. 2)**. Гемолиз эритроцитов с добавлением ХПР и без него отличается на 10-80%. Тогда как при детергентном лизисе с ЦТАБ на 0-60% и с Твин -20 на 5-40% **(рис. 1, 3)**. В эксперименте с ЦТАБ в среде содержащей 0,5М сахарозу, 0,15М NaCl, ХПР оказывает наименьший антигемолитический эффект. Степень гемолиза клеток помещенных в среды, не содержащие ХПР, статистически не отличаются от степени гемолиза в присутствии ХПР **(рис.1)**.

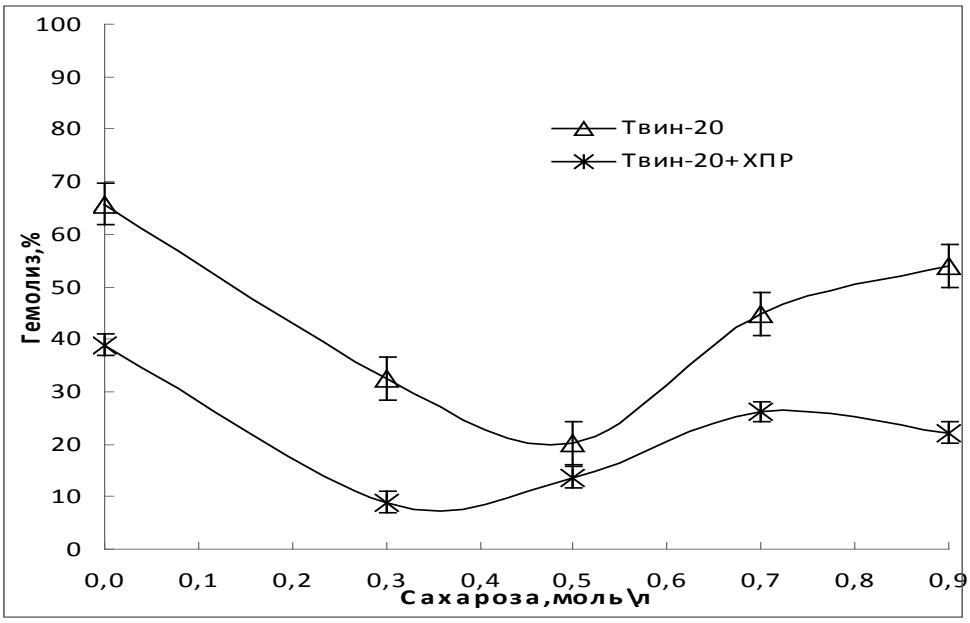

Рис.3. Влияние различных концентраций сахарозы на гемолиз эритроцитов человека под воздействием Твин-20 (30мкМ\л).
Δ - Твин-20, * - Твин-20+ХПР.

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

Таблица

Значения максимальной антигемолитической активности (АГmax) ХПР при детергентном лизисе эритроцитов

Детергент	ХПР АГ max, %
ДСН	78,94*±11
Твин-20	72,64*±11
ЦТАБ	19,36*±8

Примечание: * - P <0,05 в сравнении с контролем.

Во всех исследованных средах антигемолитическая эффективность ХПР при детергентном лизисе зависит от вида детергента, наибольшая в эксперименте с ДСН. Антигемолитическая активность ХПР при лизисе клеток ЦТАБ снижается примерно в 4 раза. Таким образом, антигемолитическая эффективность ХПР при детергентном лизисе эритроцитов с ДСН и Твин-20 гораздо выше, по сравнению с ЦТАБ. При этом антигемолитическая активность ХПР зависит от концентрации сахарозы в среде.

Предполагают, что универсальный подход к достижению криоустойчивости клеток заключается в обеспечении условий, при которых клетка обладает максимальной стабильностью при осмотической дегидратации. При этом дегидратация клеток является фактором, управляющим состоянием цитоскелета [3].

Полученные результаты позволяют предположить, что плазматическая мембрана эритроцитов, помещённых в среду, содержащую 0,15М NaCl и 0,5М сахарозу, претерпевает модификации в результате латерального

перераспределения компонентов [1]. Это приводит к уменьшению объёма клеток на предварительных этапах обработки и обуславливает высокую устойчивость к дальнейшему воздействию [9]. В результате этого наблюдается осмотически-индуцированная устойчивость клеток к стрессу. Предполагают, что механизм, лежащий в основе возрастания сохранности эритроцитов, при их обработке растворами, содержащими 0,5М сахарозу или 0,45М NaCl, связан с включением осмотического механизма нарастания устойчивости, в основе которого лежит модификация взаимодействия цитоскелета с липидным бислоем мембраны в области связей белок полосы 3 - анкирин - цитоскелет [11]. Кроме того предполагают, что сахароза способна проявлять криопротекторные свойства, действуя на белковые компоненты мембраны и стабилизировать белково-липидные взаимодействия [3]. Известно, что присутствие в среде сахарозы снижает растворимость неионных и цвитерионных детергентов и соответственно уменьшает их критические концентрации мицелообразования (ККМ) [10, 22].

Одним из методологических подходов в мембранологии является исследование структурных изменений в мембране под воздействием различных модификаторов и детергентов. Детергенты - группа амфифильных соединений, способных взаимодействовать в мембранах гидрофобными связями, одновременно взаимодействуя полярными группами с водой [4]. Известны две модели солюбилизации и фрагментации мембран детергентами [17]. Первая - кооперативное связывание молекул детергента с мембраной при последующем переносе внутрь клетки и связывании с внутренним монослоем; вторая – экстракция липидов из внешнего монослоя мембраны прямым переносом в детергентные мицеллы. В обоих случаях мембраны фрагментируются с образованием смешанных везикул, содержащих молекулы детергентов и липипдов или детергентов и белков [17]. Скорость и тип солюбилизации биологических мембран зависит от состояния и природы детергента и мембраны [16].

Катионный детергент ЦТАБ лизирует клетки и ядра, денатурирует белки и образует с ними положительно заряженные комплексы [2]. ЦТАБ в водных растворах образует мицеллы, размеры которых увеличиваются с ростом его концентрации [6].

Анионный детергент - ДСН лизирует клетки и ядра, денатурирует белки и образует с ними отрицательно заряженные комплексы, разрушает нуклеопротеиды [2]. Этот детергент, разрушает нековалентные связи в белках, денатурирует их, способствуя потере молекулой её нативности. Известно, что анионы ДСН связываются с основной цепью пептида в соотношении один анион ДСН для каждых двух остатков аминокислоты. Это придает отрицательный заряд белку, который значительно больше, чем первоначальный. Электростатическое напряжение, которое создаётся при связывании с ДСН, способствует отталкиванию белков друг от друга и изменению белковых структур мембраны [17].

Неионный детергент Твин-20 относится к ряду полиоксиэтилен-производных детергентов. Твин-20 используется для обработки мембран с целью удаления периферических белков[17].

Вышеизложенные данные согласуются с результатами, полученными нами. Как уже упоминалось выше, действие детергентов обусловлено способностью связываться гидрофобными связями с белковыми компонентами мембраны. Именно за счет такого встраивания детергентов обеспечивается разрушение связей между компонентами мембраны и в конечном итоге, солюбилизация биомембран [4]. Осмотическое воздействие, как фактор способный резко повышать устойчивость эритроцитов к охлаждению и переносу в гипертонические растворы, связано с усилением гидрофобных связей в мембране [12]. Потому осмотическое воздействие препятствует возникновению повреждений вызванных детергентами в среде содержащей 0,5Мсахарозу, 0,15MNaCl **(рис.1-3)** [12].

Кривые гемолиза с Твин-20 **(рис.3)** имеют более сглаженный вид, по сравнению с данными описывающими лизис с ДСН и ЦТАБ **(рис. 1,2)**. Это говорит о том, что ионные детергенты (ДСН и ЦТАБ) оказывают более значительное воздействие на мембраны эритроцитов, чем неионный Твин-20. Неионные детергенты (Твин-20) приводят к разрыву белково-липидных связей, не вызывая повреждения белковых компонентов мембраны [18]. В отличии от действия ионных (ЦТАБ, ДСН) детергентов, которое связано не только с воздействием на границе белок-липид, но и на денатурацию самих белков [18].

Известно, что ХПР протектирует эритроциты от повреждения при различных стрессовых воздействиях. При осмотических стрессах: гипотоническом [16], гипертоническом [8,12,13], постгипертоническом [7], холодовом шоке [8,12], а также лизисе клеток, вызванном действием порообразующих агентов [21].

При встраивании соединений во внешний монослой мемраны должно происходить перераспределение веществ и (или) мембранных компонентов между двумя моношарами чтобы мембрана сохраняла стабильную би-

шаровую конфигурацию. Это подтверждает данные о перераспределении спин-меченых фосфолипидов под действием ХПР [20]. Возможно, в момент резкого изменения условий среды пертурбация мембран амфифилами делает её более лабильной, что позволяет мембране лучше адаптироваться к действию стрессовых факторов.

Антигемолитическое действие ХПР, по-видимому, обусловлено своеобразным встраиванием амфифила на границе белок-липид которое препятствует разрыву связей между компонентами мембраны, вызванными действием детергентов.

Сравнивая выраженность защитного действия ХПР на эритроциты при детергентном лизисе с ЦТАБ и Твин-20 можно предположить, что она обусловлена различиями действия на мембрану ионных и неионных детергентов. Твин-20 разрывает связи белок-липид и не вызывает денатурацию самих белковых молекул [18], как ЦТАБ и ДСН. Возможно, в связи с этим ХПР обладает большей пертурбирующей возможностью при детергентном лизисе с Твин-20. Кроме того, так как по одному из мнений, местами связывания ХПР в мембране являются кислые полифосфоиноситидные липиды [14], ХПР способен конкурентно препятствовать встраиванию Твин-20 в мембрану эритроцитов. И, соответственно, антигемолитическая активность ХПР в экспериментах с ЦТАБ и ДСН ниже, чем при детергентном лизисе с Твин-20.

Как упоминалось ранее, анионный детергент ДСН денатурирует белки, образуя с ними отрицательно заряженные комплексы [2]. Заряд таких комплексов значительно больше, чем первоначальный заряд белка. Молекула ХПР несёт положительный заряд и встраивается во внутренний монослой мембраны, взаимодействуя с отрицательно заряженным фосфатидилсерином [15]. Возможно, эти сведения указывают на способность к лучшему связыванию положительно заряженного ХПР с мембраной в случае экспериментов с обработкой ДСН. Электростатическое напряжение, которое создаётся при связывании с ДСН, способствует отталкиванию белков друг от друга [13], однако содействует притяжению ХПР. Это объясняет наибольший процент антигемолитической активности ХПР на детергентный лизис ДСН.

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что ХПР является универсальным амфифилом для защиты клеток не только при осмотическом и холодовом стрессе, но и детергентном лизисе эритроцитов человека. Выраженность защитного влияния ХПР зависит от вида детергента.

Выводы.

1. Среда, содержащая 0,15М NaCl, 0,5М сахарозу оказывает защитное действие на эритроциты при детергентном лизисе, вызванном как ионными, так и неионными детергентами.

2. ХПР обладает антигемолитической активностью при детергентном лизисе с ионными (ЦТАБ, ДСН) и неионными (Твин-20) детергентами.

3. Выраженность максимальной антигемолитической активности ХПР зависит от вида детергента.

Перспективы дальнейших исследований. Значительный практический и теоритический интерес представляет изучение влияния ХПР на эритроциты, обработанные модификаторами мембраны и цитоскелета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А.М. Криобиология / А.М.Белоус, В.И. Грищенко – К.: Наукова Думка, 1994. - 432 с.
2. Богатов В.В. Виділення ДНК та РНК для фармації. Методи виділення ДНК та РНК, розглянуті з точки зору промислової фармації / В.В. Богатов // Одесса: Всесоюз. селекц.-генетич. ин-т, 1983. - № 4(50). - С. 41 – 47.
3. Бондаренко В.А. Эффекты дегидратации в контроле холодовой и осмотической чувствительности клеток / В.А.Бондаренко, Т.П.Бондаренко, С.В.Руденко // Проблемы криобиологии. - 1992.- №4. - С.14-25.
4. Введение в биомембранологию: [учеб. Пособие / под ред. А.А.Болдырева.]- М.:Издательство МГУ., 1990.- С.87-98.
5. Ершов С.С. Сравнительный анализ чувствительности эритроцитов млекопитающих к изменению осмотических условий среды / С.С.Ершов, Е.Е. Нипот, В.Н.Зуева // Биология - наука XXI века: IX междунар. Пущинская школа-конференция молодых ученых, 18-22 апр. 2005: тезисы докл. - Пущино, 2005. - С.161-162.
6. Исследование агрегационного поведения аминометилированных фенолов и каликс(4)резорциноренов в среде вода – ДМФА – ЦТАБ методом ЯМР ФП ИГМП / З.Ш. Идиятуллин, В.П. Архипов, Я.А. Бабкина [и др.] // Материалы докладов VIII Всероссийской конференции «Структура и динамика молекулярных систем» - Институт органической физической химии им.А.Е.Арбузова КНЦ РАН. - 2002. - №6 – С.43-48.
7. Нипот Е.Е. Изучение механизмов повреждения эритроцитов при дегидратации- регидратации и действии некоторых литических пептидов: дис... канд. биол. наук: 03.00.19. / Нипот Елена Евгеньевна. - Харьков, 1997. – 159с.
8. Орлова Н. В. Влияние амфифильных соединений на осмотическую и температурную чувствительность эритроцитов: дис... канд. биол. наук: 03.00.19. / Орлова Наталья Владимировна - Харьков, 2001. –140с.
9. Поздняков В.В .Объёмный сдвиг как фактор, контролирующий осмотическую устойчивость эритроцитов в растворах низкомолекулярных криопротекторов / В.В. Поздняков, В.А. Бондаренко // Сборник научных трудов. Ак.наук Укр ССР Инст.пробл. криобиол. и криомед.– Харьков, 1990. - С.115-123.
10. Рамазанов В.В. Влияние криопротекторов на устойчивость эритроцитов к детергентам при модификации агрегатного состояния белка полосы 3. / В.В. Рамазанов, В.А. Бондаренко // Проблемы криобиологии, 2007.- Том17, №4.-С.335-345.
11. Рамазанов В.В. Влияние осмотического стресса и модификаторов цитоскелета на развитие холодового и гипертонического шока эритроцитов: Дис. ... канд. биол.

наук: 03.00.19 / Рамазанов Виктор Владимирович - Харков, 1993. - 100с.
12. Шпакова Н.М. Действие криопротекторов и амфипатических соединений на состояние эритроцитов, подвергнутых холодовому и омотическому шоку: дисс. ...канд. биол. наук: 03.00.19/ - Харьков, 1988.- 191 с.
13. Шпакова Н.М. Антигемолитический эффект хлорпромазина при гиперосмотическом и холодовом шоке эритроцитов / Н.М. Шпакова, Е.Р. Панталер., В.А. Бондаренко // Биохимия., 1995.- 60, №10.- С. 1624-1631.
14. Selective amphipathic nature of chlorpromazine binding to plasma membrane bilayers / Chen J.Y., Brunauer L.S., Chu F.C. [et al.] // Biochim Biophys Acta., 2003. - Vol.1616, №1- P.95-105.
15. Eskelinen S. The hypotonic hemolysis and the protective action of lysophosphatidylcholine. / S. Eskelinen, P. Saukko // Biorheology., 1984. - Vol.21, №3-P.363-377.
16. Hagerstrand H. Amphiphil-induced antihemolisisis not causally related to shape changes and vesiculation / H. Hagerstrand, B. Isooma // Chem.- Biol. Inter., 1991- Vol.79, №3. - P.335-347.
17. Kragh-Hansen U. The mechanism of detergent solubilisation of liposomes and protein-containing membranes / U. Kragh-Hansen, M. Le Maire, J.V. Moller // Biophys.J., 1998. – Vol. 75, №6. - P.2932-2946.
18. Le Maire M. Interection of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents / M. Le Maire, P. Champeil, J.V. Moller // Biochim. Biophys. Acta., 2000. - Vol. 1508. - P.86-111.
19. Matson R.S. Use of high-performance size exclusion chromatography to determine the extent of detergent solubilisation of human erythrocyte ghosts / R.S. Matson, S.C. Goheen // J. Chromatogr., 1986.- Vol. 359.- P. 285-295.
20. Rosso J. Influence of chlorpromazin e on the transverse mobility of phospholipids in the human erythrocyte membrane: relation to shape changes / J. Rosso, A. Zachowski, P.F. Devaux // Biochim Biophys Acta., 1988.- Vol.942, №2. - P.271-279.
21. Rudenko S.V. Protection by chlorpromasine, albumin and bivalent cations against haemolisis indused by melittin [Ala-14] melittinand whole bee venom / S.V. Rudenko, E.E. Nipot // Biochem. J., 1996. - 317. - P.747-754.
22. The vesicle to micelle transition of phosphatildylcholine vesicle induced by nonionic detergents: effects of sodium chloride, sucrose and urea / Walter A., Kuehl G., Barnes K., [et al.] // Biochim. Biophys. Acta., 2000.- Vol. 1508, №1-2. - P.20-33.

УДК 612.111:577.1:57083.332

АНТИГЕМОЛІТИЧНА ДІЯ ХЛОРПРОМАЗИНУ НА ЕРИТРОЦИТИ ЛЮДИНИ ПРИ ДЕТЕРГЕНТНОМУ ЛІЗИСІ

Маркова Х.В., Рамазанов В.В., Бондаренко В.А.

Резюме. Досліджували лізис еритроцитів людини під впливом цетілтриметіламонійброміду (ЦТАБ), додецил-сульфату натрію (ДСН), поліоксіетілєнсорбітан монолаурату (Твін-20) в присутності хлорпромазину (ХПР). Показали, що ХПР має антигемолітичну активність при детергентному лізисі еритроцитів людини. Крім того, з'ясували, що величина антигемолітичної активності ХПР залежить від того, яким детергентом проводили лізис еритроцитів. Найбільші значення антигемолітичної активності ХПР спостерігаються в експериментах з іонним негативно зарядженим ДСН, а найменьщі – з катіонним детергентом ЦТАБ. Найменші показники гемолізу спостерігалися в середовищі, що містить 0,5М сахарозу, 0,15М NaCl, 20 мМ Тріс РН 7,4, незалежно від виду присутнього детергенту.

Ключові слова: еритроцити, хлорпромазин, детергенти.

UDC 612.111:577.1:57083.332

ANTI-HAEMOLYTIC ACTION of CHLORPROMAZINE on HUMAN ERYTHROCYTES in CASE of DETERGENT LYSIS

Markova C.V., Ramazanov V.V., Bondarenko V.A.

Summary. Erythrocyte lysis was investigated in case of action ofcetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), sodium dodecyl sulfate (SDS) and polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tvin -20) in the presence of chlorpromazine (CPZ). It was shown, that chlorpromazine has an anti-haemolytic action in human erythrocyte detergent lysis. Besides, it was worked out that level of chlorpromazine anti- haemolytic action depends on the kind of detergent used in lytic process. The biggest values of chlorpromazine anti-haemolytic activity was observed in experiments with ion-negative charged SDS, and the smallest – with cation detergent CTAB. Minimal levels of haemolysis were observed in the medium containing 0,5 M succrose, 0,15 M NaCl, 20mM Trys pH 7.4 with no dependence on the type of present detergent.

Key words: erythrocytes, chlorpromazine, detergents.

Стаття надійшла 27.01.2009 р.