

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ N-АЛКАНОЛОВ И ХЛОРПРОМАЗИНА НА ГИПОТОНИЧЕСКИЙ ГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ БАРАНА И КУРИЦЫ В СРЕДАХ РАЗЛИЧНОГО СОСТАВА

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. Гипотонический лизис представляет собой явление разрушения эритроцитов при их помещении в среды с пониженной осмолярностью, когда происходит избыточное поступление воды в клетки и их набухание. В указанных условиях эритроцит достигает критического гемолитического объема и, в результате избыточного натяжения мембраны на ней формируются поры, проницаемые не только для электролитов, но и для гемоглобина [1,11,12]. Модификация мембранной структуры веществами различной химической природы способна привести к изменению чувствительности клеток к действию осмотического стресса. В частности хорошо известно защитное влияние амфифильных соединений на эритроциты человека в условиях, когда изменяются температурные и осмотические параметры среды [2,7]. К настоящему времени накоплен значительный объем экспериментальных материалов о влиянии спиртов на различные клеточные структуры и характеристиках проницаемости плазматической мембраны для этих веществ [3,4,5,13,14]. Однако, ясная картина, отражающая аспекты их взаимодействия с клетками в ситуации, когда изменяются осмотические параметры среды, в том числе и на уровне осмотического стресса, отсутствует.

Цель исследования. Изучение влияния n-алканолов на эритроциты в стрессовых условиях (гипотонический шок), которые часто используются как модель для изучения клеточных реакций и адаптивных механизмов, [6,10] а также для выявления патологических состояний и наследственных заболеваний, связанных с дефектами клеточных структур. Особенный интерес представляет, изучение влияния веществ, модифицирующих клеточные структуры, с использованием эритроцитов разных видов, отличающихся по белковому и фосфолипидному составу, в частности, эритроцитов барана и курицы.

Объект и методы исследования. Эритроциты получали из свежесконсервированной крови, заготовленной на глюцицировом консерванте. Кровь у птиц (куры) забирали из подкрыльцовой вены шприцом.

Место забора предварительно дезинфицировали 70% этанолом. Кровь забирали в стерильную пробирку (обычно в объеме 2,0 – 3,0 мл) на глюцицировом консерванте. Образцы хранили в холодильнике и использовали в день забора. Кровь барана получали из яремной вены. Участок забора выстригали и дезинфицировали 70% этанолом. Кровь забирали на глюцицировый консервант в стерильные флаконы в объеме 250-350 мл и хранили в холодильнике при +4оС. После удаления плазмы эритромаксу трижды отмывали путем центрифугирования при 1500 г в течение 3 мин в 10-кратном объеме физиологического раствора (0,15 Моль/л хлорид натрия, 0,01 Моль/л трис-буфер, рН 7,4). Лейкоцитарную пленку и супернатант удаляли методом аспирации. Осадок эритромаксы содержал в среднем 80 % клеток. Эритроциты в виде плотного осадка хранили при 4°С и использовали в течение 4 часов.

Для того, чтобы оценить осмотическую устойчивость эритроцитов, аликвоту клеток из сток раствора (гематокрит 1%) переносили в гипотоническую среду (60-75 ммоль/л NaCl, 10 ммоль/л Трис-HCl; 40-60 ммоль/л Na₂SO₄, 10 ммоль/л Трис-HCl; 70-80 ммоль/л сахараза, 10 ммоль/л Трис-HCl, рН 7,4) при комнатной температуре (22-23оС). Концентрация электролита и неэлектролита подбирались таким образом, чтобы гемолиз в среде составлял примерно 50-60 %. Для изучения влияния n-алканолов на развитие гипотонического гемолиза эритроцитов, в литическую среду добавляли спирты в конечных концентрациях 54-324 ммоль/л бутанола и 1-15 ммоль/л гексанола и перемешивали до полного растворения исследуемых веществ в среде, а затем добавляли клетки. Для изучения влияния хлорпромазина на развитие гипотонического гемолиза эритроцитов его добавляли в литическую среду в конечных концентрациях 7,5-150 мкмоль/л, а затем добавляли клетки.

Для регистрации динамики гемолиза эритроцитов в работе была использована установка для измерения светорассеяния клеточных суспензий, созданная на базе монохроматора СФ-4А. Динамика гемолиза эритроцитов была измерена спектрофотометрическим методом на длине волны 720 нм при расходимости светового пучка 3 градуса. В кювету с изотоническим раствором (2 мл) при постоянном перемешивании вводили 6-10 мкл суспензии клеток (время перемешивания 2 с).

Уровень гипотонического гемолиза рассчитывали по формуле: Гипотонический гемолиз = (1-А/

A_0) 100%, где A_0 – оптическая плотность контрольного образца, A – оптическая плотность исследуемого образца. Коэффициент ингибирования определялся как отношение уровня гемолиза в присутствии вещества к уровню гемолиза в его отсутствие.

Статистическую обработку выборок с нормальным распределением проводили с использованием t -критерия Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение.

На **рис. 1** представлены типичные кривые динамики гемолиза эритроцитов курицы и барана в отсутствие (а) и в присутствии (б, в) бутанола.

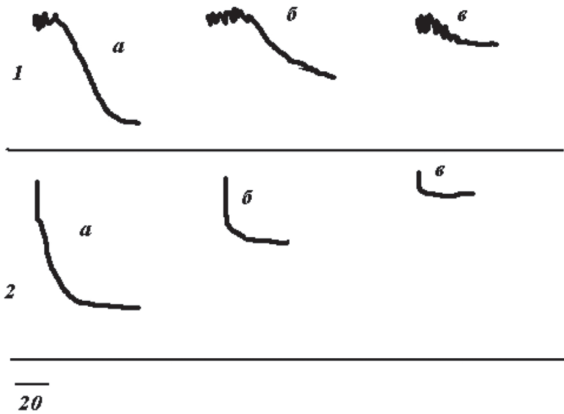


Рис. 1. Типичные кривые динамики гипотонического гемолиза эритроцитов курицы (1) и барана (2) в отсутствие (а) и в присутствии (б – 50 мМ, в – 330 мМ) бутанола.

В присутствии гексанола наблюдается аналогичная картина. Видно, что по мере увеличения концентрации бутанола уровень гемолиза уменьшается а в случае эритроцитов курицы уменьшается и скорость гемолиза. Видно, что в случае эритроцитов барана оптическая плотность исследуемой суспензии значительно уменьшается в пределах очень короткого промежутка времени (порядка 20 секунд) и далее оптическая плотность практически не изменяется. В случае эритроцитов курицы наблюдается более медленное изменение оптической плотности,

вероятно, с предварительной фазой набухания и изменения формы клеток и при этом гемолитический процесс завершается в интервале 1 минуты при максимальном повреждении клеток.

Наблюдаемые особенности развития гемолитического процесса эритроцитов разных видов вероятно связаны с различиями в белковом и фосфолипидном составе их мембран [8,9]. Указанные различия играют важную роль в контроле связей мембраноцитоскелет и, следовательно, оказывают влияние на особенности формирования гемолитических пор. Наблюдаемая динамика развития гемолиза эритроцитов курицы свидетельствует, что в этом случае происходит формирование пор небольшого размера, что сопровождается изменением объема и формы клеток и только со временем формируется пора, проницаемая для гемоглобина. В случае эритроцитов барана медленная фаза процесса отсутствует и быстро формируется пора, проницаемая для гемоглобина.

Если снижение уровня гемолиза можно связать с уменьшением критического гемолитического объема клеток при включении в мембрану молекул спиртов, то в случае снижения скорости гемолиза на первый план выходит такой фактор как динамика формирования гемолитической поры.

Этот процесс существенно зависит от стабилизирующего влияния белков мембраны и цитоскелета на липидный бислой, и, соответственно, в ядерных эритроцитах курицы с высоким уровнем интеграции цитоплазматической белковой сети вклад белков в структурную динамику мембраны может быть существенно более выраженным.

На **рис. 2** сравнивается антигемолитическая активность исследуемых веществ на гипотонический гемолиз эритроцитов барана и курицы инкубируемых в растворах NaCl при максимально эффективной концентрации исследуемого вещества (**табл. 1**). Видно, что максимальную эффективность в случае эритроцитов барана проявляет гексанол, в то время как в случае эритроцитов курицы – хлорпромазин.

Таблица 1

Сравнительная таблица влияния эффективных концентраций алканолов и хлорпромазина на уровень гипотонического гемолиза эритроцитов барана и курицы

Вещество	Вид эритроцитов	Среда инкубации		
		NaCl	Na ₂ SO ₄	Сахароза
Бутанол, мМ	Баран	250	150	350
	Курица	200	250	100
Гексанол, мМ	Баран	20	20	20
	Курица	15	5	15
Хлорпромазин, мкМ	Баран	-	-	-
	Курица	40	75	40

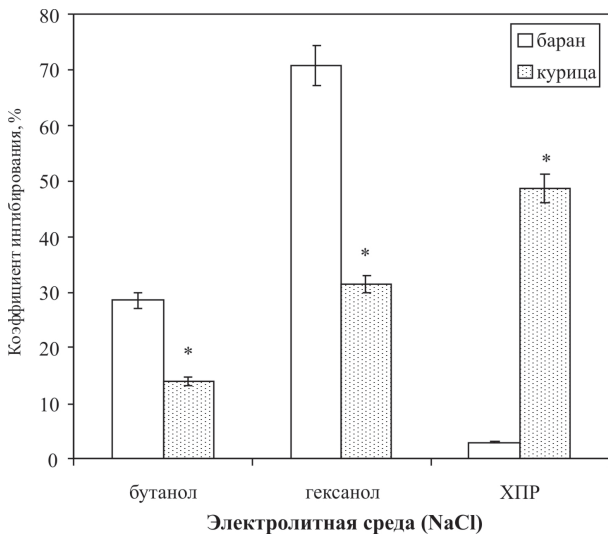


Рис. 2. Коэффициент ингибирования гипотонического гемолиза эритроцитов разных видов при максимально эффективной концентрации протектирующего вещества.

Примечание: * – достоверно отличается от эритроцитов барана ($p < 0,05$).

Следует отметить, что хлорпромазин не проявляет антигемолитической активности по отношению к эритроцитам барана.

При замене аниона хлора на анион сульфата (рис. 3) антигемолитическая активность хлорпромазина для эритроцитов курицы немного снижается, тогда как бутанола и гексанола увеличивается. Для эритроцитов барана антигемолитическая активность указанных веществ достоверно не изменяется. Это может быть связано с особенностями анионного транспорта в эритроцитах разных видов.

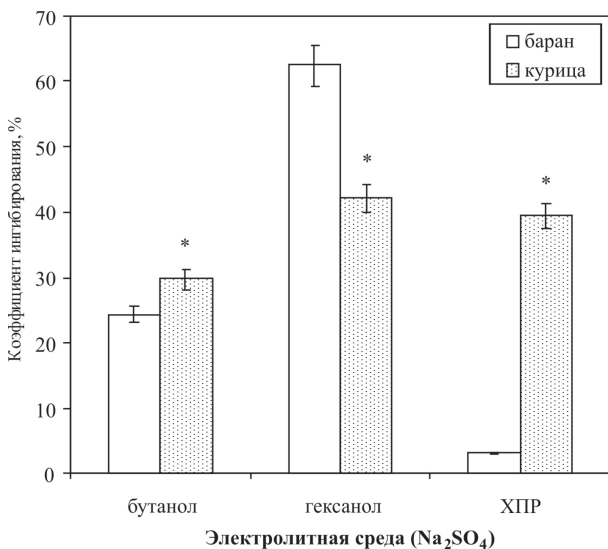


Рис. 3. Коэффициент ингибирования гипотонического гемолиза эритроцитов разных видов при максимально эффективной концентрации протектирующего вещества.

Примечание: * – достоверно отличается от эритроцитов барана ($p < 0,05$).

При замене электролитной среды на неэлектролитную (рис. 4) антигемолитическая активность спиртов и хлорпромазина существенно уменьшается при осмотическом воздействии на оба вида эритроцитов. Исключением является гексанол, который сохраняет свою протектирующую активность по отношению к эритроцитам барана независимо от состава среды.

Различия в протектирующей эффективности исследуемых веществ в электролитных и неэлектролитных средах связана, вероятно, с изменением транспортных процессов и проницаемости мембраны в неэлектролитной среде в результате чего защитное действие бутанола снижается [2]. С другой стороны, менее выраженная антигемолитическая активность спиртов в неэлектролитной среде может быть связана с ограничениями накладываемыми на связывание исследуемых веществ с поверхностью мембраны при изменении электростатических свойств ее поверхности.

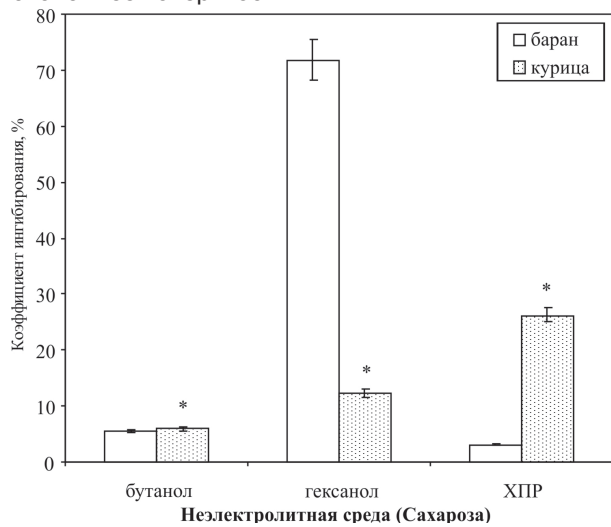


Рис. 4. Коэффициент ингибирования гипотонического гемолиза эритроцитов разных видов при максимально эффективной концентрации протектирующего вещества.

Примечание: * – достоверно отличается от эритроцитов барана ($p < 0,05$).

Более эффективное действие хлорпромазина в случае эритроцитов курицы по сравнению с эритроцитами барана может быть связано с различиями в динамике гипотонического гемолиза этих двух видов клеток. Известно, что хлорпромазин уменьшает размер пор, формируемых при гипотоническом лизисе и ускоряет их закрытие [12]. Поскольку, исходя из динамики лизиса, мы предполагаем, что в эритроцитах курицы в начале гемолитического процесса формируется много мелких пор, а в эритроцитах барана быстро формируется одна большая пора, действие хлорпромазина будет более эффективным в первом случае. С другой стороны, нельзя исключить различную способность хлорпромазина встраиваться в мембраны эритроцитов разных видов, так как они значительно различаются по фосфолипидному составу [7,8,9]. Так, эритроциты

барана практически не содержат фосфатидхолина в отличие от эритроцитов курицы и человека, по отношению к которым хлорпромазин проявляет выраженное ингибирующее действие в условиях гипотонического гемолиза.

Выводы.

1. Эритроциты барана и курицы подвергаются гемолизу при переносе в гипотоническую среду, уровень и скорость которого определяется видовой принадлежностью клеток. Изменение осмотических условий среды влияет на уровень гемолиза эритроцитов барана, но не влияет на скорость процесса, в то время как в случае эритроцитов курицы осмотические условия влияют не только на уровень, но и на скорость гемолитического процесса.

2. Уровень гипотонического гемолиза эритроцитов барана и курицы снижается при включении в среду нейтральных амфилов *n*-гексанола и *n*-бутанола. Действие *n*-алканолов зависит от состава среды, оно менее выражено в неэлектролитной среде, включающей сахарозу, и более – в электролитной среде, включающей как анионы Cl⁻, так и анионы SO₄²⁻. При этом эффективные концентрации *n*-гексанола на порядок ниже таковых в случае *n*-бутанола.

3. *N*-гексанол проявляет существенно более выраженный, по сравнению с *n*-бутанолом, ингибирующий эффект на развитие гипотонического гемолиза эритроцитов барана, в то время как в случае эритроцитов курицы ингибирующая эффективность *n*-алканолов проявляет сходный характер. Как в случае эритроцитов барана, так и в случае эритроцитов курицы ингибирующее действие бутанола возрастает при замене в среде анионов Cl⁻ на анионы SO₄²⁻ и при максимальных концентрациях *n*-бутанола эффективность в эритроцитах курицы существенно более выражена по сравнению с эритроцитами барана.

4. Хлорпромазин, являющийся катионным амфилом, оказывает защитное действие на гипотонический гемолиз эритроцитов курицы, уменьшая как уровень, так и скорость гемолиза, и неэффективен по отношению к эритроцитам барана.

Перспективы дальнейших исследований.

Дальнейшее развитие данной проблемы предполагает исследование влияния *n*-алканолов на осмотическую устойчивость эритроцитов разных видов млекопитающих, а также привлечения к исследованию других амфифильных веществ.

Список литературы

1. Гордиенко Е.А. Физико-химическая модель явления гипотонического гемолиза эритроцитов человека / Е.А. Гордиенко, Ю.Е. Панина // *Біофізичний вісник*. – 1998. - №422, Вип. 2. - С. 54-58.
2. Дунаевская О.Н. Некоторые возможности повышения устойчивости эритроцитов к холодному и гиперосмотическому воздействию при использовании катионных амфилов / О.Н. Дунаевская, Е.Р. Панталер, Н.М. Шпакова [и др.] // *Проблемы криобиологии*. - 1995. - № 1. - С. 21-27.
3. Brahm J. Permeability of human red cells to a homologous series of aliphatic alcohols / J. Brahm // *J. Gen. Physiol.* – 1983. - № 81. - P. 283-304.
4. Forman S.A. *n*-Alkanols and halothane inhibit red cell anion transport and increase band 3 conformational change rate / S.A. Forman, A.S. Verkman, J.A. Dix [et al.] // *Biochemistry*. – 1985. - № 24. - P. 4859-4866.
5. Katsuki H. Ionic strength influences hemolytic action of dibucaine hydrochloride / H. Katsuki, S. Tateyama, N. Hidaka [et al.] // *Masui*. – 2003. - V.52, №11. - P. 1174-80.
6. Lang F. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms / F. Lang, G.L. Busch [et al.] // *Physiological Reviews*. – 1998. - V.1, № 78. - P. 247-306.
7. Lieber, M.R. Interaction of chlorpromazine with human erythrocyte membrane / M.R. Lieber, Y. Lange, R.S. Weinstein, [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1984. - № 259. - P. 9225-9234.
8. Matei H. Comparative studies of the protein composition of red blood cell membranes from eight mammalian species / H. Matei, L. Frentescu, Gh. Benga // *J. Cell. Mol. Med.* – 2000. - Vol.4, № 4. - P. 270-276.
9. Nouri-Sorkhabi M. H. Phospholipid composition of erythrocyte membranes and plasma of mammalian blood including Australian marsupials; quantitative ³¹P NMR analysis using detergent / M. H. Nouri-Sorkhabi, N.S. Agar, D. R. Sullivan [et al.] // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1996. - V.113B, № 2. - P. 221-227.
10. O'Neill W.C. Cl⁻-dependent K transport in a pure population of volume-regulating human erythrocytes / W.C. O'Neill // *Am. J. Physiol.* – 1989. - № 256. - P. 858-864.
11. Sato Y. Mechanism hypotonic hemolysis of human erythrocytes / Y. Sato, H. Yamakose, Y. Suzuki // *Biol. Farm. Bull.* – 1993. - Vol. 16, № 5. - P. 506-512.
12. Sato Y. Participation of band 3 in hypotonic hemolysis of human erythrocytes / Y. Sato, H. Yamakose, Y. Suzuki // *Biol. Farm. Bull.* – 1993. - Vol. 16, № 2. - P. 188-194.
13. Toon M.R. Transport parameters in the human red cell membrane: solute-membrane interactions of hydrophilic alcohols and their effect on permeation / M.R. Toon, A.K. Solomon // *Biochim Biophys Acta.* – 1990. - V 16; № 1022(1). - P. 57-71.
14. Schwichtenhovel C. Alcohols produce reversible and irreversible acceleration of phospholipid flip-flop in the human erythrocyte membrane / C. Schwichtenhovel, B. Deuticke, C. Haest // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 1992. - № 1111. - P. 35-44.

УДК 612.111.014.43.462.1:547.36

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ *N*-АЛКАНОЛОВ И ХЛОПРОМАЗИНА НА ГИПОТОНИЧЕСКИЙ ГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ БАРАНА И КУРИЦЫ В СРЕДАХ РАЗЛИЧНОГО СОСТАВА

Нипот Е.Е.

Резюме. Работа посвящена изучению влияния *n*-алканолов (гексанол, бутанол) и катионных амфилов (хлорпромазин) на уровень и скорость гипотонического гемолиза эритроцитов курицы и барана в средах, содержащих электролит (NaCl, Na₂SO₄) и неэлектролит (сахарозу). Предполагается, что

различия в протектирующей эффективности исследуемых веществ в электролитных и неэлектролитных средах, связано, вероятно, с изменением транспортных процессов и проницаемости мембраны, а также электростатических свойств ее поверхности. Обсуждаются особенности гипотонического гемолиза эритроцитов разных видов (баран, курица).

Ключевые слова: эритроцит, алканоли, хлорпромазин, гипотонический гемолиз, электролитная и неэлектролитная среды.

УДК 612.111.014.43.462.1:547.36

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ N-АЛКАНОЛІВ ТА ХЛОПРОМАЗИНУ НА ГІПОТОНІЧНИЙ ГЕМОЛІЗ ЕРИТРОЦИТІВ БАРАНА ТА КУРКИ У СЕРЕДОВИЩАХ РІЗНОГО СКЛАДУ

Ніпот О.Є.

Резюме. Робота присвячена вивченню впливу n-алканолів (гексанол, бутанол) і катіонних амфіфілів (хлорпромазин) на рівень та швидкість гіпотонічного лізису еритроцитів куриці та барана в середовищах, що містять електроліт (NaCl, Na₂SO₄) та неелектроліт (сахарозу). Передбачається, що відмінності в протекуючій здатності досліджуваних речовин в електролітних і неелектролітних середовищах, зв'язані, ймовірно, зі зміною транспортних процесів і проникності мембрани, а також електростатичними властивостями її поверхні. Обговорюються особливості гіпотонічного гемолізу еритроцитів різних видів (баран, курка).

Ключові слова: еритроцит, алканоли, хлорпромазин, гіпотонічний гемолиз, електролітне та неелектролітне середовища.

UDC 612.111.014.43.462.1:547.36

Study Of Influence N-Alkanols And Chlorpromazine On Hypotonic Hemolysis Of Red Blood Cells Of Ram And Hen In Medium Of Different Composition

Nipot E.E.

Summary. The article is dedicated the study of influence of n-alkanols (hexanol, butanol) and chlorpromazine on a level and speed of hypotonic hemolysis of red blood cells of hen and ram in medium, containing electrolyte (NaCl, Na₂SO₄) and neelektrolit (sucrose). It is assumed that distinctions in protecting efficiency of the substanses in electrolyte and unelectrolyte medium, it is caused probably by the change of transport processes and permeability of membrane, and also electrostatic properties of its surface. The features of hypotonic hemolysis of red blood cells of different kinds (ram, hen) are discussed.

Key words: red blood cells, alkanols, chlorpromazine, hypotonic hemolysis, electrolyte and unelectrolyte mediums.

Стаття надійшла 23.11.2011 р.