

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ МОДИФИКАЦИЙ МЕМБРАНЫ И ЦИТОСКЕЛЕТА НА АНТИГЕМОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ХЛОРПРОМАЗИНА В УСЛОВИЯХ ГИПОТОНИЧЕСКОГО ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Государственное учреждение «Институт микробиологии и иммунологии им. И. И. Мечникова Национальной академии медицинских наук 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 актуально исследование механизмов повреждения и защиты клеток в условиях действия стрессовых факторов, которые, прежде всего, влияют на плазматическую мембрану клетки. При этом особое внимание уделяется изучению гипотонического гемолиза эритроцитов, как объекта фундаментальных и прикладных исследований. Химические соединения, которые действуют на мембранные компоненты и компоненты цитоскелета, модифицируют их и/или связи между ними. При этом одни вещества оказывают защитное влияние, а другие – гемолизирующее. Известно, что устойчивость эритроцитов к изменению осмотических и температурных условий среды может повышаться при наличии в среде веществ, влияющих на процессы замыкания мембранных пор, в частности амфифильного вещества хлорпромазин [4]. Существует предположение, что различные условия, при которых происходит воздействие, оказывают влияние на способность проявления амфифильными веществами своих защитных свойств. В настоящее время недостаточно данных о характере действия амфифилов при модификации мембран эритроцитов, что требует дальнейшего тщательного изучения.

В связи с вышеизложенным, **целью** данной **работы** явилось изучение влияния модифицирующих соединений, вносящих изменения в структуру цитоскелет-мембранного комплекса (ЦМК) эритроцитов человека, на антигемолитическую эффективность хлорпромазина (ХПР) в условиях гипотонического гемолиза.

Объект и методы исследования. В работе использовали эритроциты донорской крови мужчин II группы, полученные по стандартной методике.

Гипотонический лизис эритроцитов осуществляли перенесением аликвот клеточной суспензии в гипотонические среды, содержащие NaCl, (гематокрит 0,4%) при 37°C на 5 мин, после этого пробы центрифугировали и определяли содержание

гемоглобина в надосадке спектрофотометрическим методом ($\lambda = 543$ нм). Для экспериментов были использованы концентрации NaCl, в которых уровень гипотонического гемолиза клеток составлял примерно 70%.

Обработку эритроцитов модификаторами ЦМК осуществляли при температуре 37°C в среде для инкубации [11], в которой находился соответствующий модификатор. Модификацию эритроцитов йодацетамидом (ЙАА) (15 мМ) проводили по методу – [2], парахлормеркурийбензоатом натрия (ПХМБ) (1 мМ) и 4,4'-диизотиоцианато-стильбен-2,2'-дисульфатом (ДИДС) (50 мкМ) – по методу – [3], N-этилмалеимидом (N-ЭМ) (10 мМ) – [14], комбинированную обработку ЙАА/ПХМБ – [8, 14]. Модифицированные эритроциты отмывали средой для инкубации и хранили до использования при 4°C не больше 30 мин.

ХПР добавляли в гипотоническую среду перед внесением клеток. Конечная концентрация ХПР составляла 80 мкМ.

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

Результаты исследований и их обсуждение. На **рис.** представлены данные, характеризующие влияние ХПР на клетки, предобработанные модификаторами, в условиях гипотонического гемолиза. Видно, что ХПР снижает уровень гемолиза клеток при предобработке всеми модификаторами. Однако все используемые вещества снижают протекторные способности ХПР: повреждение клеток, предобработанных модификаторами в присутствии ХПР, больше, чем немодифицированных клеток.

В эритроцитарной мембране при обработке модификаторами развиваются процессы, приводящие к снижению пертурбирующей активности ХПР при встраивании в мембрану. Однако протекторное влияние ХПР не исчезает при влиянии всех использованных веществ.

Видно, что антигемолитическая (АГ) активность ХПР зависит от используемого модификатора ЦМК. В частности, N-ЭМ оказывает наименьшее влияние на АГ активность ХПР и данные, полученные при влиянии N-ЭМ, статистически не отличаются от контрольных эритроцитов. Это говорит о том, что это вещество оказывает наименьшее влияние на пертурбирующие способности ХПР и практически не влияет на его АГ

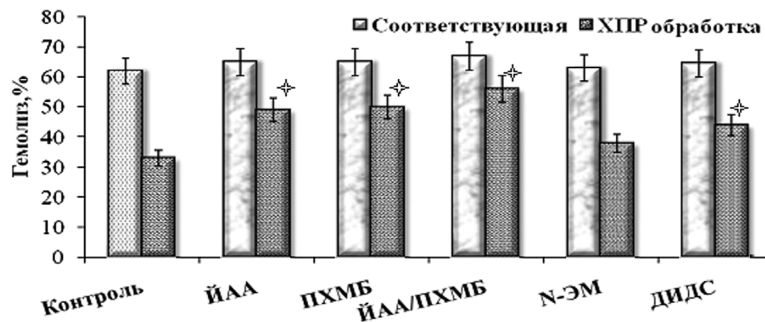


Рис. 1. Влияние модификаций цитоскелет-мембранного комплекса и ХПР (80 мкМ) на уровень гипотонического гемолиза эритроцитов человека.

Примечание: – отличия достоверны в сравнении с контролем, $P < 0,05$.

эффективность. При влиянии ДИДС АГ активность ХПР снижается. Защитные способности ХПР при предобработке ПХМБ и предобработке ИАА характеризуется близкими показателями. Наименее выраженными протекторными свойствами амфирил ХПР обладает при комбинированной обработке ИАА/ПХМБ.

Без предварительной обработки мембран ИАА, который блокирует цитоплазматический пул и 50 % мембранных белков, ПХМБ не связывается с ПХМБ-специфической SH-группой белка полосы 3, связываясь с другими пятью из шести SH-групп белка полосы 3 [10, 18]. Поэтому в данном случае полный эффект действия меркуриата на белок не прослеживается, что также подтверждают данные электрофореза [1]. Результаты электрофоретического анализа свидетельствуют, что белковый спектр мембран эритроцитов, обработанных ИАА, качественно не изменяется [1]. Таким образом, дополнительная обработка эритроцитов ИАА усиливает модифицирующее действие ПХМБ на мембрану, способствуя связыванию ПХМБ с ПХМБ-специфической SH-группой белка полосы 3. Можно предположить, что вследствие этого существенно изменяются белок-липидные взаимодействия. Пертурбирующее влияние ХПР на модифицированные таким образом эритроциты снижается т. к., влияя на белок-липидные взаимодействия, эти вещества влияют и на расположение липидов, с которыми связывается ХПР. Таким образом, ПХМБ влияет на белок-липидные взаимодействия, а ИАА лишь усиливает данное воздействие. Препятствуя встраиванию ХПР в мембрану, ИАА/ПХМБ тем самым снижают его протекторное влияние на клетки.

Механизм действия N-ЭМ сходен с таковым для ИАА. N-ЭМ также является сульфгидрильным реагентом, однако он способен блокировать до 80 % SH-групп мембраны [10] в отличие от ИАА, блокирующего меньшее количество белковых SH-групп. В свою очередь блокада N-ЭМ (и в меньшей степени ИАА) специфических SH-групп на спектрине сдвигает равновесие между димерным и тетрамерным состоянием спектрина в сторону образования димеров, в результате чего его связь с мембраной ослабляется [17]. При действии ИАА/ПХМБ наблюдается замедление перехода спектрина из тетрамерной в димерную форму. Следовательно, можно

предположить, что изменение состояния спектрина в сторону димерности как при действии N-ЭМ не влияет на встраивание ХПР в липидный бислой. Тогда как преобладание тетрамерных форм спектрина является неблагоприятным фактором для связывания ХПР с мембраной эритроцитов. Таким образом, изменение структуры мембраны под действием N-ЭМ несущественно влияет на пертурбирующие возможности ХПР при гипотоническом гемолизе.

ДИДС известен как ингибитор анионного транспорта, а также он индуцирует структурную реорганизацию цитоскелетных компонентов [7], уменьшает их экстрагируемость из мембран [12], вызывает эхиноцитоз [6]. Согласно данным литературы, ДИДС уменьшает связывание белка полосы 3 с анкирином и белком полосы 4. 1 [7]. Оба эти белка связывают цитоскелет с мембраной. Очевидно, что в нашем случае ДИДС, ковалентно связываясь с белком полосы 3 и, этим самым, модифицируя взаимодействие белка полосы 3 с цитоскелетом, вызывает такие изменения, которые способствуют ослаблению защитного эффекта ХПР. В работе [16] было показано, что тетрамер является преобладающей формой белка полосы 3, связывающейся с анкирином. Обработка ДИДС, которая способствует переходу большей части популяции белка полосы 3 в димеры, приводит к элиминации большинства анкирин-связывающих участков на мембране [16]. Возможно, элиминация анкирин-связывающих участков в мембране ведет к такому перераспределению компонентов мембраны, которое приводит к снижению связывания ХПР с мембраной. Кроме того, диссоциация тетрамеров белка полосы 3 с помощью ДИДС в димеры приводит к увеличению поверхностной площади в участках контакта белка полосы 3 с липидным бислоем и, в конечном итоге, ослаблению связывания данного белка с мембранным скелетом [5]. Также отмечается изменение взаимодействия холестерина с белком полосы 3 в липидном бислое [9] и увеличение прочности связи цитоскелета с данным белком. То есть неблагоприятное действие ДИДС на мембраны при гипотоническом гемолизе, а также на АГ активность ХПР может быть обусловлено как действием на анионный транспорт, так и структурными изменениями мембраны эритроцитов под действием модификатора.

Все эти данные позволяют говорить о ключевой роли компонентов цитоскелета и/или взаимодействий с мембраной в контроле чувствительности эритроцитов к действию неблагоприятных факторов, а также в контроле эффективности антигемолитического воздействия ХПР. Дополнительная модификация мембран эритроцитов приводит к изменению состояния и расположения белковых и липидных компонентов мембраны. А так как местами связывания ХПР в мембране являются

полифосфоинозитидные липиды [15], то изменение их расположения приводит к снижению пертурбирующей активности ХПР и, следовательно, его антигемолитической эффективности.

Выводы.

1. ХПР снижает уровень гипотонического лизиса контрольных эритроцитов и эритроцитов, обработанных модификаторами цитоскелет-мембранного комплекса.

2. Обработка эритроцитов такими модификаторами цитоскелет-мембранного комплекса, как ПХМБ (1 мМ), ИАА (15 мМ), ИАА/ПХМБ, ДИДС (0,05

мМ) снижает уровень антигемолитической активности хлорпромазина при гипотоническом гемолизе эритроцитов.

3. Уровень антигемолитической активности ХПР в условиях гипотонического гемолиза и обработки ЦМК зависит от используемого вещества.

Перспективы дальнейших исследований. В дальнейших исследованиях целесообразно изучить влияние модификаторов ЦМК и ХПР на сохранность эритроцитов в условиях действия низких температур и гипертонических растворов.

Литература

1. Введение в биомембранологию: Учеб. пособие / под ред. А. А. Болдырева. – М.: Изд-во МГУ. – 1990. – 208 с.
2. Влияние прочности связи периферических белков с мембранами на гипертонический шок / В. В. Рамазанов, А. Ю. Семенченко, Е. Л. Воловельская [и др.] // Проблемы криобиологии. – 1996. – №3. – С. 8 – 11.
3. Влияние ингибиторов анионного транспорта и модификаторов мембраны на постгипертонический лизис эритроцитов: дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук: спец. 03. 00. 19 «Паразитология» / Олейник Ольга Александровна. – Х., 2004. – 137 с.
4. Шпакова Н. М. Действие хлорпромазина на температурную и осмотическую чувствительность эритроцитов / Н. М. Шпакова, В. А. Бондаренко // Биохимия. – 1991. – Т. 56, № 12. – С. 2125–2130.
5. Analysis of integral membrane protein contributions to the deformability and stability of the human erythrocyte membrane / H. M. Van Dort, D. W. Knowles, J. A. Chasis, [et al.] // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276. – P. 46968 – 46974.
6. Band 3 antagonists, p-azidobenzylphlorizin and DIDS, mediate erythrocyte shape and flexibility changes as characterized by digital image morphometry and microfiltration / D. M. Hoefner, M. E. Blank, B. M. Davis, [et al.] // J. Membr. Biol. – 1994. – Vol. 141, № 1. – P. 91 – 100.
7. Changes in the structural-functional state of erythrocyte membranes treated with anion transport inhibitors / E. I. Slobozhanina, I. E. Fedorovich, N. M. Kozlova [et al.] // Biofizika. – 1986. – Vol. 31. – P. 800 – 803.
8. Clark S. J. The dissociation of peripheral proteins from erythrocyte membranes brought about by p-mercuribenzenesulfonate / S. J. Clark, G. B. Ralston // Biochim. Biophys. Acta. – 1990. – Vol. 1021, №2. – P. 141 – 147.
9. Daleke D. L. Phospholipid flippases / J Biol Chem. 2007 – Vol. 282, № 2 – P. 821 – 825.
10. Deuticke B. The role of membrane sulfhydryls in passive, mediated transport processes and for the barrier function of the erythrocyte membrane / B. Deuticke // Membrane biochemistry. – 1986. – Vol. 6, № 4. – P. 309 – 326.
11. Haest C. W. M. Topology of membrane sulfhydryl groups in the human erythrocyte. Demonstration of a non-reactive population in intrinsic proteins / C. W. M. Haest, D. Kamp, B. Deuticke // Biochim. Biophys. Acta. – 1981. – Vol. 643. – P. 219 – 326.
12. Hsu L. The interaction of human erythrocyte band 3 with cytoskeletal components / L. Hsu, M. Morrison // Arc. Biochem. Biophys. – 1983. – Vol. 227, № 1. – P. 31 – 38.
13. Liu S. C. Hemoglobin enhances the self-association of spectrin heterodimers in human erythrocytes / S. C. Liu, J. Palek // J. Biol. Chem. – 1984. – Vol. 259. – P. 11556 – 11562.
14. Sato Y. Participation of band 3 in hypotonic hemolysis of human erythrocytes / Y. Sato, H. Yamakose, Y. Suzuki // Biol. Phar. Bull. – 1993. – Vol. 16, № 2. – P. 188 – 194.
15. Selective amphipathic nature of chlorpromazine binding to plasma membrane bilayers / J. Y. Chen, L. S. Brunauer, F. C. Chu [et al.] // Biochim Biophys Acta. – 2003. – Vol. 1616, № 1 – P. 95 – 105.
16. Van Dort H. M. Effect of band 3 subunit equilibrium on the kinetics and affinity of ankyrin binding to erythrocyte membrane vesicles / H. M. Van Dort, R. Moriyama, P. S. Low // J. Biol. Chem. – 1998. – Vol. 273. – P. 14819 – 14826.
17. Yang M. Effect of sulfhydryl reagents on spectrin states on the erythrocyte membrane / M. Yang // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1993. – Vol. 192, № 2. – P. 918 – 925.
18. Zhang Z. H. Effect of PCMB on anion transport in human red cell membranes / Z. H. Zhang, A. K. Solomon // BBA. – 1992. – Vol. 1106, № 1. – P. 31 – 39.

УДК 612. 111:577. 352. 462

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ РІЗНИХ МОДИФІКАЦІЙ МЕМБРАНИ І ЦИТОСКЕЛЕТА НА АНТИГЕМОЛІТИЧНУ АКТИВНІСТЬ ХЛОПРОМАЗИНУ В УМОВАХ ГІПОТОНІЧНОГО ГЕМОЛІЗУ ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ

Михайленко Х. В.

Резюме. В роботі дослідили вплив модифікуючих сполук: йодацетаміду (ІАА), парахлормеркурійбензоату натрію (ПХМБ), ІАА/ПХМБ, 4,4'-діізотіоціанато-стильбен-2,2'-дисульфону (ДІДС), N-етилmaleїміду (N-ЕМ), які змінюють структуру цитоскелет-мембранного комплексу еритроцитів людини, на антигемолітичну ефективність хлорпромазину (ХПР) в умовах гіпотонічного гемолізу. З'ясували, що ХПР знижує рівень гіпотонічного лізису, як контрольних еритроцитів, так і еритроцитів, оброблених модифікаторами цитоскелет-мембранного комплексу. Проте, при впливі на еритроцити людини модифікаторів (ПХМБ (1 мМ), ІАА (15 мМ), ІАА/ПХМБ, N-ЕМ (10 мМ), ДІДС (0,05 мМ)) рівень антигемолітичної активності хлорпромазину знижується і залежить від використовуваної речовини.

Ключові слова: еритроцити, хлорпромазин, модифікатори цитоскелет-мембранного комплексу.

УДК 612. 111:577. 352. 462

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ МОДИФИКАЦИЙ МЕМБРАНЫ И ЦИТОСКЕЛЕТА НА АНТИГЕМОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ХЛОРПРОМАЗИНА В УСЛОВИЯХ ГИПОТОНИЧЕСКОГО ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Михайленко К. В.

Резюме. В работе исследовано влияние модифицирующих соединений: йодацетамида (ЙАА), параклормеркурийбензоата натрия (ПХМБ), ЙАА/ПХМБ, 4,4'-диизотиоцианато-стильбен-2,2'-дисульфоната (ДИДС), N-этилмалеимида (N-ЭМ), изменяющих структуру цитоскелет-мембранного комплекса эритроцитов человека, на антигемолитическую эффективность хлорпромазина (ХПР) в условиях гипотонического гемолиза. Обнаружили, что ХПР снижает уровень гипотонического лизиса, как контрольных эритроцитов, так и эритроцитов, обработанных модификаторами цитоскелет-мембранного комплекса. Однако, при влиянии на эритроциты человека модификаторов (ПХМБ (1 мМ), ИАА (15 мМ), ИАА/ПХМБ, N-ЭМ (10 мМ), ДИДС (0,05 мМ)) уровень антигемолитической активности хлорпромазина снижается и зависит от используемого вещества.

Ключевые слова: эритроциты, хлорпромазин, модификаторы цитоскелет-мембранного комплекса.

UDC 612. 111:577. 352. 462

Research of Influence of Different Modifications of Membrane and Cytoskeleton on Antihemolytic Activity of Chlorpromazine under Hypotonic Lysis of Human Erythrocytes

Mikhailenko K. V.

Summary. Compounds that operate on membrane components and components of cytoskeleton modify them and/or connections between them. Thus one substances render protective influence, and other – hemolyzing. It is known that stability of erythrocytes to the change of osmotic and temperature terms of environment can rise at presence of in the environment of substances influencing on the processes of shorting of membrane pores, in particular amphipath substance chlorpromazine.

Influence of modifying connections is in process investigational: yodacetamid (YAA), sodium p-chloromercuribenzoate (PCMB), YAA / PCMB, 4,4 – diisothiocyanato-stil'ben- of 2,2 – disulphonate (DIDS), N- etil-maleimid (N-EM) changing the structure of cytoskeleton-membrane complex of red blood cells, on antihemolytic efficiency of chlorpromazine (CPR) in the conditions of hypotonic lysis. Discovered that CPR reduced the level of hypotonic lysis, both control erythrocytes and erythrocytes treat the modifiers of cytoskeleton-membrane complex. However, at influence on the human erythrocytes of modifiers (PCMB (1 мМ), YAA (15 мМ), YAA / PCMB, N-EM (10 мМ), DIDS (0,05 мМ)) the level of antihemolytic activity of chlorpromazine goes down and depends on the used substance. In particular, N-EM renders the least influence on antihemolytic activity of CPR and data got at influence of N-EM, statistically does not differ from control erythrocytes. It talks that this substance renders the least influence on the perturbing capabilities of CPR and practically efficiency does not influence on his antihemolytic activity. At influence of DIDS on antihemolytic activity of CPR goes down. Protective capabilities of CPR at pre-treatment of PCMB and pre-treatment of YAA characterized by near indexes. Possesses the least expressed protector properties of amphipath substance CPR at the combined treatment of YAA / PCMB.

The aftertreatment of red blood cells of YAA strengthens the modifying operating of PCMB on a membrane, assisting binding of PCMB to PCMB – by the specific SH- groups of protein band 3. It is possible to suppose that hereupon protein-lipids cooperations change substantially. Perturbing influence of CPR on the erythrocytes modified thus goes down as, influencing on protein-lipids co-operations, these substances influence and on the location of lipids CPR contacts with that. Thus, PCMB influences on protein-lipids cooperations, and YAA only strengthens this influence.

The mechanism of action of N-EM is similar with such for YAA. N-EM also is a sulfhydryl reagent, however he is able to block to 80 % SH-groups of membrane unlike YAA blackout less of the proteins SH- groups.

DIDS, covalently contacting with the protein band 3 and, this same, modifying cooperation of protein band 3 with a cytoskeleton, causes such changes that assist weakening of protective effect of CPR

The obtained data allow to talk about the key role of components of cytoskeleton and/or cooperating with a membrane in control of sensitiveness of erythrocytes to the action of unfavorable factors, and also in control of efficiency of antihemolytic influence of CPR. Additional modification of membranes of red blood cells causes the change of the state and location of proteins and lipids components of membrane. And because the places of fastening of CPR in a membrane are polyphosphatidylinositol lipids, the that change of their location results in the decline of perturbing activity of CPR and, consequently, to his antihemolytic efficiency.

Key words: erythrocytes, chlorpromazine, modifiers of cytoskeleton-membrane complex.

Рецензент – проф. Лобань Г. А.

Стаття надійшла 16. 09. 2013 р.