

ВПЛИВ МЕМБРАНОТРОПНИХ РЕЧОВИН НА ЧУТЛИВІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ ССАВЦІВ ДО ДІЇ ПОСТГІПЕРТОНІЧНОГО ШОКУ

О. Чабаненко*, Н. Єршова, Н. Орлова, Н. Шпакова

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України
вул. Переяславська, 23, Харків 61016, Україна
e-mail: chabanenkoolena@gmail.com*

У роботі досліджено вплив трифторперазину (ТФП) і децил- β ,D-глюкопіранозиду (ДГП) на чутливість еритроцитів людини, кролика та щура до дії постгіпертонічного шоку (ПГШ) за температури 0 °С.

Показано, що ТФП виявляє високу антигемолітичну активність в умовах ПГШ еритроцитів людини і тварин за незначних відмінностей значень ефективних концентрацій. Антигемолітична активність ТФП для еритроцитів людини і кролика становить ~60 %, а для клітин щура ефективність цієї сполуки вища приблизно в 1,4 разу.

Значення антигемолітичної активності ДГП за умов ПГШ еритроцитів людини і щура сумірні та дорівнюють 62 і 66 % відповідно. Статистично значущі відмінності за цим параметром (72 %) встановлено для клітин кролика порівняно з еритроцитами людини.

Встановлено, що за розміром плато (діапазон концентрацій амфіфільних речовин, у межах якого спостерігається мінімальний рівень гемолізу еритроцитів) катіонний ТФП і неіонний ДГП значно відрізняються. Так, ТФП має вузьке плато (100–200 мкмоль/л), у той час як ДГП – широке (400–1600 мкмоль/л). Крім того, спостерігається зміщення плато концентрацій ДГП до більш високих значень порівняно з ТФП, що, ймовірно, пов'язано з тим, що критична концентрація міцелоутворення ДГП вища за ТФП.

Показано, що за умов ПГШ еритроцитів людини обидві сполуки (ТФП і ДГП) виявляють сумірну антигемолітичну активність. Якщо для клітин кролика ДГП є ефективним порівняно з ТФП, а для клітин щура – навпаки, то ефективність ТФП вища за ДГП. Це може бути пов'язано з відмінностями фосфоліпідного складу еритроцитарних мембран ссавців.

Отримані результати свідчать, що за умов ПГШ ефективність мембранотропних речовин швидше за все обумовлена їхньою здатністю вбудовуватися в мембрану в місці формування дефектів, і в такий спосіб значно збільшувати критичний гемолітичний об'єм клітин, як наслідок, запобігати їхньому руйнуванню.

Ключові слова: еритроцити ссавців, постгіпертонічний шок, трифторперазин, децил- β ,D-глюкопіранозид, постгіпертонічний гемоліз

На сьогодні актуальною проблемою є кріоконсервування клітин крові з метою їхнього тривалого зберігання. Запаси кріоконсервованої крові та її компонентів необхідні для трансфузії під час оперативних втручань і гострих крововтрат, особливо за надзвичайних ситуацій та військових дій [8, 10].

Для дослідження впливу на еритроцити окремих факторів кріопошкодження, які діють на етапах заморожування і розморожування біологічного матеріалу, застосовують модельні експерименти. Так, для дослідження впливу факторів кріопошкодження під час

заморожування клітин використовують моделі: гіпертонічний шок (ГШ) і гіпертонічний криогемоліз (ГК), а під час розморожування – модель постгіпертонічного шоку (ПГШ). Наразі є багато робіт із вивчення особливостей розвитку ГШ і ГК еритроцитів людини і тварин [1, 5], у той час як модель ПГШ клітин ссавців вивчена недостатньо.

Модель ПГШ передбачає вивчення розвитку постгіпертонічного гемолізу (ПГГ) еритроцитів за перенесення їх із гіпертонічних умов в ізотонічні. У гіпертонічному середовищі клітини внаслідок зневоднення стискаються і при подальшому поверненні їх в ізотонічне середовище набухають, що призводить до розвитку ПГГ еритроцитів. Вивчення ПГШ еритроцитів людини показало, що деякі амфіфільні сполуки (залежно від використаної концентрації) здатні або знижувати рівень гемолізу клітин, або підвищувати його. Ці речовини чинять мембранотропну дію через здатність їхніх молекул вбудовуватися та розподілятися в еритроцитарній мембрані. Прояв їхньої антигемолітичної активності залежить як від конкретної використаної речовини, так і від стану клітинної мембрани, який, у свою чергу, визначається фізико-хімічними факторами навколишнього середовища. Так, антигемолітична активність мембранотропних речовин реєструється за умов ПГШ еритроцитів людини із застосуванням близьконульових температур [2].

Еритроцити ссавців, які характеризуються загальним планом будови плазматичної мембрани, мають деякі видові особливості її складу [16]. Це дає змогу припустити відмінність у прояві ефективності мембранотропних сполук за умов ПГШ цих клітин.

У зв'язку з вищевикладеним доцільно дослідити реакцію еритроцитів людини, щура і кролика, які характеризуються відмінностями цитоскелет-мембранного комплексу [16], на дію ПГШ за наявності трифторперазину і децил- β ,D-глюкопіранозиду. Вибір зазначених мембранотропних речовин обумовлений тим, що вони різні за характером трансмембранного розподілу в еритроцитарній мембрані: катіонний трифторперазин переважно вбудовується у внутрішній моношар ліпідного бішару, у той час як неіонний децил- β ,D-глюкопіранозид – у зовнішній [12].

Мета роботи: вивчити вплив трифторперазину і децил- β ,D-глюкопіранозиду на чутливість еритроцитів людини, кролика та щура до дії постгіпертонічного шоку (0 °C).

Матеріали та методи

Для дослідження використовували еритроцити, отримані з цільної крові людини, щура і кролика. Кров була заготована на консерванті «Глюгіцир» («Біофарма», Україна). Донорську кров здорових чоловіків А (II)⁺ групи віком від 20 до 35 років було надано Харківським обласним центром служби крові. Донорами крові слугували здорові статевозрілі самці 12-місячних кроликів і 6-місячних щурів, наданих віварієм Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Експерименти проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447–IV від 21.02.2006 р.) із дотримання вимог Комітету з біоетики Інституту, узгоджених із положенням «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

Еритроцити одержували методом центрифугування цільної крові за 1000 g упродовж 3 хв у 10-кратному об'ємі фізіологічного розчину (0,15 моль/л NaCl, 5 ммоль/л фосфатний буфер, pH 7,4) з подальшим видаленням плазми і лейкоцитарного шару. Постгіпертонічний шок еритроцитів здійснювали шляхом перенесення клітин у розчин, що містив 1,65 моль/л NaCl (середовище дегідратації), на 20 хв із подальшим перенесенням аліквоти у фізіологічний розчин (середовище регідратації) на 5 хв за температури 0 °C. Амфіфільні речовини додавали в середовище регідратації перед внесенням у нього клітин [2]. Кількість гемоглобіну в супернатанті визначали спектрофотометрично ($\lambda = 543$

нм) [15]. Кінцевий гематокрит становив 0,4 %. За 100 % приймали поглинання зразка, до якого додавали детергент тритон X-100 у концентрації 0,1 %. Для оцінки ефективності амфіфільних сполук за умов ПГШ еритроцитів використовували поняття максимальної антигемолітичної активності, плато й ефективних концентрацій. Антигемолітичну активність (АГ) амфіфілу виражали як відсоток зниження гемолізу клітин за наявності речовин щодо гемолізу у пробі, яка не містить даної сполуки. Плато визначали як діапазон концентрацій амфіфільних речовин, у межах якого спостерігається мінімальний рівень гемолізу еритроцитів, а ефективну концентрацію – як концентрацію речовини, що відповідає середині плато.

У роботі використовували такі реактиви: трифторперазин («Sigma», США), децил- β ,D-глюкопіранозид («Calbiochem», США), тритон X-100 («Serva» Німеччина) і реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації «хч» і «чда». Усі середовища були приготовані на фосфатному буфері (5 ммоль/л, рН 7,4).

Статистичну обробку отриманих експериментальних результатів проводили за допомогою програми «Statistica 6.0» (StatSoft Inc., США). Експериментальні дані представлені як медіана результатів (Me) і ступінь розсіювання у вигляді інтерквартильного інтервалу (Q1–Q3). Для перевірки статистичної значущості відмінностей досліджуваних числових показників використовували критерій Вілкоксона. Відмінності вважали значущими за $p < 0,05$.

Результати і їхнє обговорення

Еритроцити ссавців, перенесені з гіпертонічних середовищ до фізіологічного розчину, лізують [2, 13]. Слід зазначити, що рівень ПГГ еритроцитів залежить від умов проведення етапу дегідратації ПГШ, а саме від осмоляльності середовища і тривалості інкубування в ньому. Оскільки робота спрямована на вивчення впливу мембранотропних речовин на ПГШ еритроцитів, то рівень ПГГ еритроцитів має бути, з одного боку, досить високим, а з іншого – не перевищувати 70 %. Саме тому під час проведення ПГШ еритроцити ссавців переносили зі середовища, що містить 1,65 моль/л NaCl, у фізіологічний розчин (0,15 моль/л NaCl).

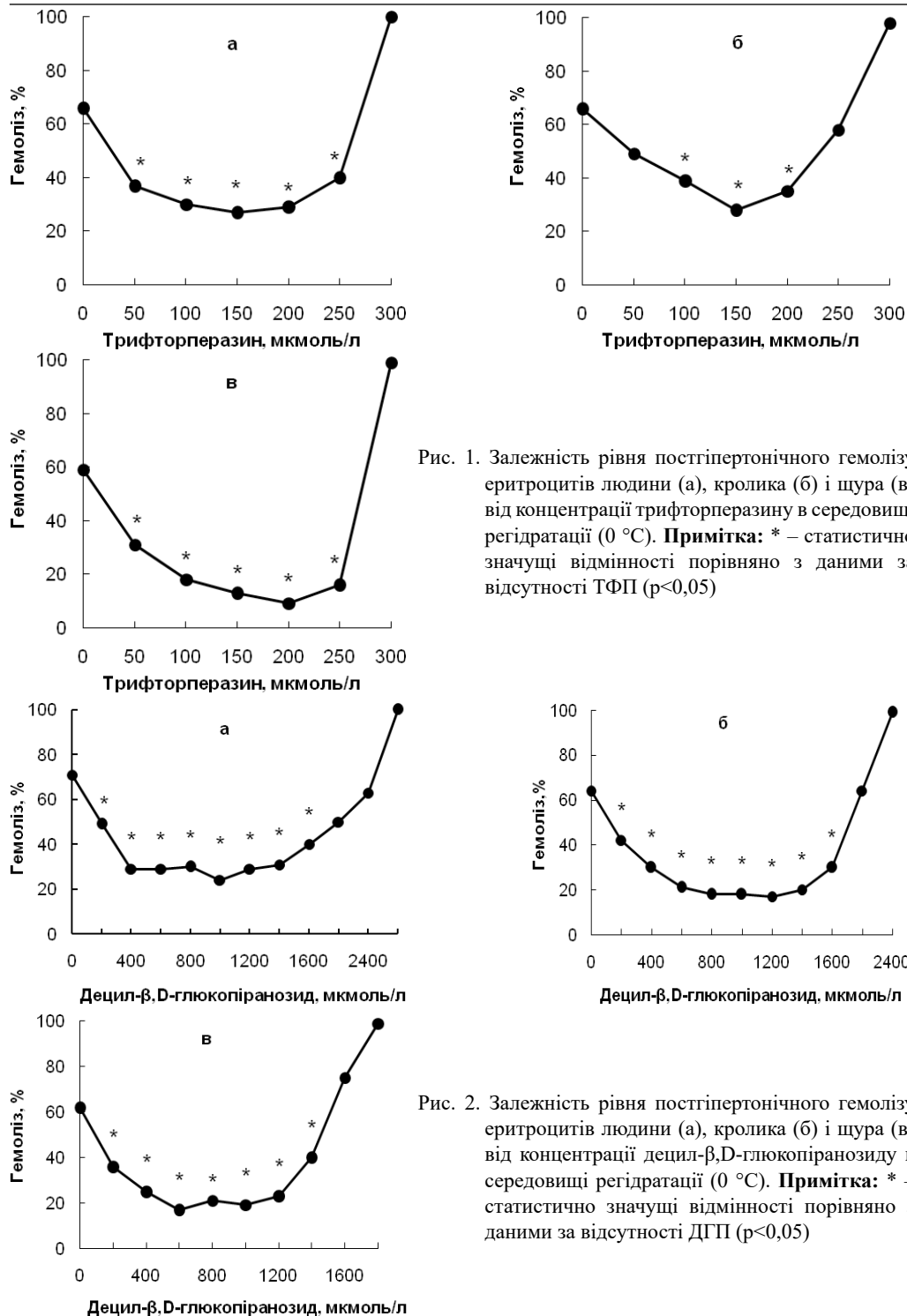
Як видно з рис. 1 і 2, рівень гемолізу еритроцитів людини і тварин за умов ПГШ перебуває у діапазоні 60–70 %.

Представлені на рис. 1 і 2 залежності гемолізу від концентрації трифторперазину (ТФП) (рис. 1) або децил- β ,D-глюкопіранозиду (ДГП) (рис. 2) характеризуються наявністю трьох ділянок. Спочатку з ростом концентрації амфіфільних сполук спостерігається зниження рівня ПГГ еритроцитів ссавців, потім за досягнення мінімального значення рівень гемолізу не змінюється і з подальшим підвищенням концентрації амфіфілу відбувається збільшення гемолізу клітин до значень, які перевищують вихідний рівень.

Звертає на себе увагу, що ТФП і ДГП значно відрізняються за розміром плато концентрацій (діапазон концентрацій амфіфільних речовин, у межах яких спостерігається мінімальний рівень гемолізу еритроцитів). Так, ТФП має вузьке плато (100–200 мкмоль/л), в той час як ДГП – широке (400–1600 мкмоль/л).

Із представлених залежностей рівня гемолізу еритроцитів від концентрації досліджуваних речовин (див. рис. 1 і 2) було визначено ефективні концентрації речовин і розраховано величини антигемолітичної активності, які наведені в табл. 1 і 2.

Це необхідно, з одного боку, для порівняльної кількісної оцінки ефективності катіонного ТФП і неіонного ДГП за умов ПГШ еритроцитів ссавців, а з іншого боку, для порівняльного аналізу видових особливостей прояву антигемолітичної активності мембранотропних сполук.



Таблиця 1

Значення максимальної антигемолітичної активності ($AG_{\text{макс}}$) та ефективних концентрацій ($C_{AG_{\text{макс}}}$) трифторперазину в умовах ПГШ еритроцитів ссавців за 0 °С (Me – медіана, Q1-Q3 – інтерквартильний інтервал, n=7)

Еритроцити	Людина	Кролик	Щур
$AG_{\text{макс}}$, %	60 (45–77)	55 (50–58)	84*# (81–89)
$C_{AG_{\text{макс}}}$, мкмоль/л	150	150	175

Примітка: *,# – статистично значущі відмінності порівняно з еритроцитами людини і кролика відповідно (p<0,05)

З табл. 1 видно, що ТФП виявляє досить високу АГ активність за умов ПГШ еритроцитів людини і тварин за незначних відмінностей ефективних концентрацій. Величини АГ активності ТФП для еритроцитів людини і кролика подібні, на відміну від клітин щура, для яких ефективність ТФП вища приблизно в 1,4 разу.

Таблиця 2

Значення максимальної антигемолітичної активності ($AG_{\text{макс}}$) і ефективних концентрацій ($C_{AG_{\text{макс}}}$) децил-β,D-глюкопіранозиду в умовах ПГШ еритроцитів ссавців за 0 °С (Me – медіана, Q1-Q3 – інтерквартильний інтервал, n=7)

Еритроцити	Людина	Кролик	Щур
$AG_{\text{макс}}$, %	62 (61–70)	72* (72–75)	66 (63–75)
$C_{AG_{\text{макс}}}$, мкмоль/л	1000	1000	800

Примітка: * – статистично значущі відмінності порівняно з еритроцитами людини (p<0,05)

Результати, представлені в табл. 2, свідчать, що за умов ПГШ еритроцитів ссавців значення антигемолітичної активності неіонного ДГП для еритроцитів людини і щура перебувають приблизно на одному рівні, у той час як для клітин кролика виявлено невеликі, але статистично значущі відмінності порівняно з еритроцитами людини.

Повшкодження еритроцитів за умов ПГШ на етапі дегідратації еритроцитів пов'язують із формуванням трансмембранних дефектів, які збільшуються до розміру гемолітичних пор під час повернення клітин у середовище регідратації. У момент дії стресового фактора (у нашому випадку різке зниження осмоляльності середовища) амфифільні молекули, наявні в середовищі регідратації, вбудовуються і розподіляються у мембрані, запобігаючи при цьому розвитку трансмембранних дефектів. Той факт, що ефективні концентрації мембранотропних речовин за умов ПГШ вищі від аналогічних показників за умов ГШ і ГК (в 5–10 разів) [4], дає змогу припустити наявність іншого механізму дії амфифілів. Ефект мембранотропних речовин за умов ГШ і ГК пов'язують із розупорядкуванням мембрани, що запобігає росту трансмембранних дефектів до розміру гемолітичних пор [3, 9, 14]. За умов ПГШ ефективність речовин, швидше за все, обумовлена їхньою здатністю вбудовуватись у мембрану в місці формування дефектів і в такий спосіб значно збільшувати критичний гемолітичний об'єм клітин, як наслідок, запобігати їхньому руйнуванню.

Трифторперазин і децил-β,D-глюкопіранозид, незалежно від характеру їхнього трансмембранного розподілу, знижують рівень ПГГ еритроцитів людини і тварин (див. рис. 1 і 2). Для всіх ссавців розмір плато і, як наслідок, значення ефективних концентрацій ТФП і ДГП суттєво відрізняються. В усіх випадках спостерігається зміщення плато концентрацій ДГП до більш високих значень (порівняно з ТФП). Мабуть, це пов'язано з тим, що значення критичної концентрації міцелоутворення ДГП вище (2200 мкмоль/л) [6], ніж ТФП (42 мкмоль/л) [11].

Як показано в нашій роботі, катіонний ТФП і неіонний ДГП проявляють сумірний АГ ефект за умов ПГШ еритроцитів людини. У той же час для клітин кролика ДГП виявляє більшу ефективність порівняно з ТФП, а для клітин щура – навпаки, ефективність ТФП вища за ДГП. Це може бути пов'язано з відмінностями фосфоліпідного складу еритроцитарних мембран ссавців.

Використані в роботі мембранотропні речовини належать до різних класів поверхнево-активних речовин: катіонний ТФП і неіонний ДГП. Молекули ТФП, вбудовуючись у ліпідний бішар, переважно розподіляються у внутрішньому моношарі мембрани, що викликає трансформацію еритроцитів за типом дискоцит-стоматоцит. У свою чергу, ДГП локалізується в зовнішньому моношарі, що проявляється у збільшенні ознак ехіноцитозу клітин [12].

За умов ПГШ і за використання катіонного ТФП максимально протектуються клітини щура. Виявлений ефект може бути обумовлений здатністю еритроцитарних мембран щура зв'язувати більшу кількість молекул ТФП. Позитивно заряджені амфифільні молекули ТФП під час вбудовування в мембрану взаємодіють із негативно зарядженими фосфоліпідами, що містяться у внутрішньому моношарі мембрани. Однак результати роботи Virtanen J.A. et al. [16] свідчать, що за сумарним вмістом негативно заряджених фосфоліпідів мембрани щура не відрізняються від клітин людини і кролика. Можна припустити, що місця зв'язування молекул ТФП не обмежуються тільки зазначеними фосфоліпідами. На цю роль можуть претендувати холінмісні фосфоліпіди внутрішнього моношару мембрани. На користь цього припущення свідчать дані роботи Hendrich et al. [7], в якій показано, що ТФП може взаємодіяти з ліпосомами, що містять фосфатидилхолін (ФХ) з утворенням доменів. У роботі [16] відзначається, що ФХ, який в основному міститься в зовнішньому моношарі, частково представлений і у внутрішній частині ліпідного бішару. Зокрема, частка ФХ у внутрішньому моношарі еритроцитів щура вища в 1,2–1,4 рази порівняно з клітинами людини і кролика.

Таким чином, незалежно від фізико-хімічних властивостей, ТФП і ДГП виявляють високу антигемолітичну активність в умовах ПГШ еритроцитів людини, кролика та щура за 0 °С. Так, антигемолітична активність позитивно зарядженого ТФП становить близько 60 % для еритроцитів людини і кролика та 84 % – для клітин щура. Значення антигемолітичної активності негативно зарядженого ДГП перебуває в діапазоні 60–70 % для еритроцитів людини і тварин. За умов ПГШ еритроцитів ссавців для клітин щура більш ефективним виявився катіонний ТФП (за показником антигемолітичної активності), тоді як для клітин кролика – неіонний ДГП.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Дунаевская О. Н., Панталер Е. Р., Шпакова Н. М., Бондаренко В. А. Некоторые возможности повышения устойчивости эритроцитов к холодovому и гиперосмотическому воздействиям при использовании катионных амфипатов // Проблемы криобиологии. 1995. № 1. С. 21–27.
2. Семионова Е. А., Чабаненко Е. А., Орлова Н. В. и др. К вопросу о механизме антигемолитического действия хлорпромазина в условиях постгипертонического шока эритроцитов // Проблемы криобиологии и криомедицины. 2017. Т. 27. № 3. С. 219–229.
3. Цымбал Л. В., Орлова Н. В., Шпакова Н. М. Модификация хлорпромазином структурно-функционального состояния мембран эритроцитов // Биологические мембраны. 2005. Т. 22. № 4. С. 327–335.

4. Шпакова Н. М. Возможный механизм коррекции осмотической и температурной чувствительности эритроцитов человека с помощью алкил- β ,D-глюкопиранозидов // Проблемы криобиологии. 2009. Т. 19. № 4. С. 449–460.
5. Шпакова Н. М., Орлова Н. В., Хунот Е. Е. и др. Осмотическая чувствительность эритроцитов млекопитающих при модификации их исходного состояния // Вісн. проблем біології і медицини. 2016. Т. 3. № 130. С. 356–361.
6. Heerklotz H., Seelig J. Correlation of membrane/water partition coefficients of detergents with the critical micelle concentration // Biophys. J. 2000. Vol. 78. P. 2435–2440.
7. Hendrich A. B., Wesolowska O., Michalak K. Trifluoperazine induces domain formation in zwitterionic phosphatidylcholine but not in charged phosphatidylglycerol bilayers // Biochim. Biophys. Acta. 2001. Vol. 1510. P. 414–425.
8. Henkelman S., Noorman F., Badloe J. F., Lagerberg J. W. M. Utilization and quality of cryo-preserved red blood cells in transfusion medicine // Vox Sang. 2015. Vol. 108. P. 103–112.
9. Jiang Y. W., Gao G., Chen Z., Wu F. G. Fluorescence studies on the interaction between chlorpromazine and model cell membranes // New J. Chem. 2017. Vol. 41. N 10. P. 4048–4057.
10. Lelkens C. C. M., de Korte D., Lagerberg J. W. M. Prolonged postthaw shelf life of red cells frozen without prefreeze removal of excess glycerol // Vox Sang. 2015. Vol. 108. N 3. P. 219–225.
11. Malheiros S. V. P., Meirelles N. C., de Paula E. Pathway involved in trifluoperazine-, dibucaine- and praziquantel-induced hemolysis // Biophys. Chem. 2000. Vol. 83. P. 89–100.
12. Manaargadoo-Catin M., Ali-Cherif A., Pognas J-L., Perrin C. Hemolysis by surfactant – a review // Adv. Colloid Interface Sci. 2015. Vol. 228. P. 1–16.
13. Muldrew K. The salting-in hypothesis of post-hypertonic // Cryobiology. 2008. Vol. 57. N 3. P. 251–256.
14. Shpakova N. M., Orlova N. V., Yershov S. S. Correction of cold damage to mammalian erythrocytes by chlorpromazine to influence the dynamic structure of a membrane // Biophysics. 2019. Vol. 64. N 3. P. 367–373.
15. Sobotka H., Stewart C. P. Advanced in clinical chemistry. Vol. 8. London, New York, Academic Press, 1965. 335 p.
16. Virtanen J. A., Cheng K. H., Somerharju P. Phospholipid composition of the mammalian red cell membrane can be rationalized by a superlattice model // Proc. Natl. Acad. Sci. 1998. Vol. 95. P. 4964–4969.

Стаття надійшла до редакції 11.07.20

доопрацьована 20.10.20

прийнята до друку 07.12.20

**IMPACT OF MEMBRANETROPIC COMPOUNDS
ON THE SENSITIVITY OF MAMMALIAN ERYTHROCYTES
TO THE POSTHYPERTONIC SHOCK ACTION**

O. Chabanenko*, N. Yershova, N. Orlova, N. Shpakova

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, NAS of Ukraine
23, Pereyaslavka St., Kharkiv 61016, Ukraine
e-mail: chabanenkoolena@gmail.com*

The effect of cationic trifluoperazine (TFP) and nonionic decyl- β ,D-glucopyranoside (DGP) on the sensitivity of human, rabbit and rat erythrocytes to the action of posthypertonic shock (PHS) at 0 °C was studied in this research. Trifluoperazine shows a high antihemolytic activity under conditions of PHS of human and animal erythrocytes at slight differences of values of effective concentrations. The value of antihemolytic activity of TFP for human and rabbit erythrocytes is ~ 60 %, and for rat cells the efficiency of this compound is approximately 1.4 times higher.

The values of antihemolytic activity of DGP under PHS conditions of human and rat erythrocytes are comparable and amounts to 62 and 66 %, respectively. Significant differences of this parameter (72 %) were found for rabbit cells compared with human erythrocytes.

It was found that the size of plateau (the range of concentrations of amphiphilic compounds within the minimum level of erythrocyte hemolysis was observed) cationic TFP and nonionic DGP are significantly different. Thus, TFP has a narrow plateau (100–200 $\mu\text{mol/L}$), while DGP has a rather wide one (400–1600 $\mu\text{mol/L}$). In addition, a shift of the plateau concentrations of DGP to the region of higher values compared with TFP is observed, which is probably due to the fact that the value of the critical micelle concentration DGP is higher than TFP. Moreover, a shift of plateau concentrations of DGP to the region of higher values compared with TFP is observed, that is probably due to the fact that the value of the critical micelle concentration DGP is higher than TFP one.

It was established that under PHS conditions of human erythrocyte, both compounds (TFP and DGP) show a commensurate antihemolytic activity. At the same time, for rabbit cells, DGP is more effective compared with TFP, and for rat erythrocytes, on the contrary, the efficiency of TFP is higher than DGP. This may be due to differences in the phospholipid composition of mammalian erythrocyte membranes. The results suggest that under PHS conditions the efficacy of membrane-tropic compounds is most likely due to their ability to incorporate into membrane to the defect formation areas, and thus significantly increase the critical hemolytic volume of cells, as a result, prevent their destruction.

Keywords: mammalian erythrocytes, posthypertonic shock, trifluoperazine, decyl- β ,D-glucopyranoside, posthypertonic hemolysis