

УДК: 577.352.462:615.273.2

Антигемолитическая активность хлорпромазина в условиях гипотонического лизиса эритроцитов в средах различного катионного состава
К.В.Маркова¹, О.А.Олейник², Н.М.Шпакова²

¹Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)

Провели исследование гипотонического лизиса эритроцитов в средах, содержащих NaCl, KCl, LiCl. Показали, что гипотонический лизис эритроцитов начинается в Li⁺-содержащей среде при более высоких концентрациях соли, чем в Na⁺- и K⁺-содержащих средах. Кроме того, показали, что хлорпромазин хуже защищает эритроциты, предварительно проинкубированные 40 мин, от гипотонического повреждения по сравнению с эритроцитами, проинкубированными 20 мин. При этом антигемолитическая активность хлорпромазина наименьшая в Li⁺-содержащей среде.

Ключевые слова: эритроциты, гипотонический лизис, хлорпромазин, катионы Na⁺, K⁺, Li⁺.

Введение

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. Особое место занимает при этом гипотонический гемолиз эритроцитов, который служит постоянным объектом фундаментальных и прикладных исследований. В настоящее время хорошо известно, что хлорпромазин (ХПР) защищает эритроциты от гипотонического повреждения в средах, содержащих NaCl (Hagerstrand, Isomaa, 1991). Однако, на сегодня нет четких данных о том, способен ли ХПР защищать эритроциты от повреждения в гипотонических средах, имеющих другой катионный состав. Поэтому целью данной работы было исследовать влияние ХПР на развитие гипотонического лизиса эритроцитов в средах, содержащих NaCl, KCl, LiCl.

Объекты и методы исследования

Эритроциты получали из свежеконсервированной донорской крови, заготовленной на глюцицировом консерванте. С целью унификации объекта в работе использовали кровь мужчин II группы. После удаления плазмы эритромассу трижды отмывали путем центрифугирования при 1500 g 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°C и использовали в течение 4 часов.

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

Гипотонический лизис эритроцитов осуществляли перенесением аликвот клеточной суспензии в гипотонические среды, содержащие NaCl, KCl, LiCl (конечный гематокрит 0,5%), при 37°C на 5 мин, после этого пробы центрифугировали и определяли содержание гемоглобина в надосадке спектрофотометрическим методом ($\lambda=543$ нм). Выход гемоглобина из клеток рассчитывали в процентах по отношению к 100%-му гемолизу эритроцитов в присутствии тритона X-100 (0,1%).

Перед перенесением в гипотонические среды эритроциты (20% гематокрит) инкубировали в среде, содержащей 90 мМоль/л KCl, 45 мМоль/л NaCl, 44 мМоль/л сахарозы, 10 мМоль/л триса (pH 7,4, 37°C) в течение 20 и 40 мин. После этого клетки отмывали дважды физиологическим раствором. ХПР использовали в его эффективной концентрации 80 мкМ (концентрация ХПР, при которой наблюдается минимальное значение гипотонического гемолиза эритроцитов) (Ершов и др., 2005). ХПР добавляли в гипотоническую среду перед внесением клеток.

Значение максимальной антигемолитической активности (AG_{max}) ХПР рассчитывали по формуле:

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

, где

k – величина гемолиза эритроцитов в отсутствие ХПР;

a – минимальная величина гемолиза эритроцитов в присутствии ХПР.

Результаты

Было исследовано влияние катионного состава на процесс гипотонического лизиса эритроцитов в средах, содержащих NaCl, KCl, LiCl. На рис. 1 представлены кривые гипотонического гемолиза эритроцитов в средах с различным катионным составом.

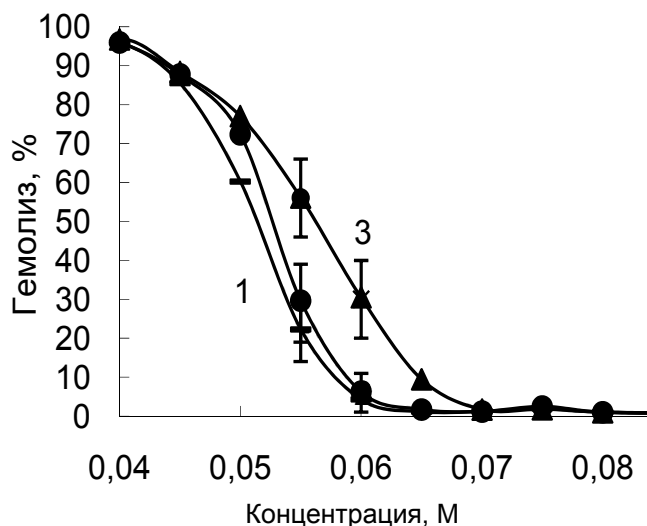


Рис. 1. Гипотонический гемолиз эритроцитов человека в средах, содержащих NaCl (1), KCl (2), LiCl (3) при 37°C

Видно, что в интервале концентраций солей 0,07–0,09 М гемолиз практически отсутствует. Развитие лизиса клеток наблюдается в средах с концентрацией солей 0,065 М и выше, причём характер и начало его развития зависят от качественного состава гипотонической среды. Так, пороговая концентрация (концентрация, при которой уровень гемолиза эритроцитов составляет примерно 10%) для NaCl соответствует 0,058 М, KCl – 0,06 М, а для LiCl – 0,067 М, что свидетельствует о большей чувствительности эритроцитов к гипотонической Li⁺-содержащей среде. Кроме того, следует отметить, что кривые зависимости гемолиза от концентрации соли в средах, содержащих NaCl и KCl, имеют сходный характер, в то время как кривая гемолиза в Li⁺-содержащей среде существенно отличается. Кривая в Li⁺-содержащей среде имеет более пологий характер, что свидетельствует о меньшей синхронности гемолиза эритроцитов по сравнению с Na⁺- и K⁺-содержащими средами.

Известно, что гипотонический лизис может блокироваться различными соединениями, в том числе и ХПР, который защищает эритроциты от гипотонического гемолиза в средах, содержащих NaCl (Hagerstrand, Isomaa, 1991). Поэтому в нашей работе использовали ХПР во всех трёх исследуемых гипотонических средах для оценки влияния катионного состава среды на эффективность данного вещества. В работах (Ямайкина, Черницкий, 1991; Gershfeld, Mugaуama, 1988) было показано, что состояние эритроцитов зависит от продолжительности инкубации клеток при 37°C. Исходя из этого, мы изначально инкубировали эритроциты различное время при 37°C в среде предварительной инкубации (см. «Объекты и методы исследования»), а затем переносили в гипотоническую среду. В экспериментах использовались гипотонические среды, уровень повреждений эритроцитов в которых составлял 65–70 %.

На рис. 2 представлены данные о влиянии ХПР на уровень гипотонического лизиса эритроцитов в средах разного состава. Видно, что в среде, содержащей NaCl, предварительная инкубация клеток при 37°C как в течение 20, так и в течение 40 мин не оказывает влияния на уровень гипотонического гемолиза эритроцитов. В присутствии ХПР наблюдается снижение уровня гипотонического лизиса эритроцитов, причём при 20 мин изотонической инкубации гемолиз снижается в большей степени, чем при 40 мин прединкубации. Отмеченные особенности гипотонического гемолиза характерны и для двух других сред. Однако, следует отметить, что в Li⁺-содержащей среде ХПР не снижает уровень гипотонического лизиса клеток, которые предварительно инкубировались 40 мин.

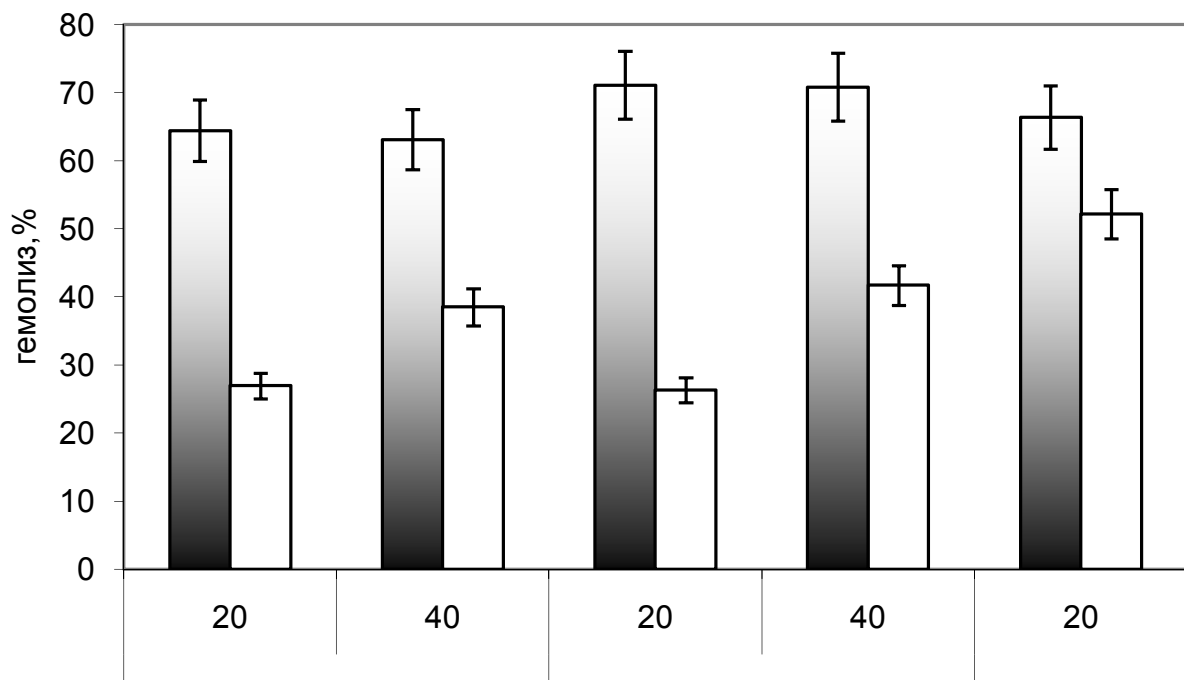


Рис. 2. Влияние продолжительности прединкубации и ХПР (80 мкМ) на гипотонический лизис эритроцитов в средах, содержащих NaCl, KCl, LiCl при 37°C

■ контроль,
□ ХПР.

Для того чтобы оценить эффективность ХПР, были подсчитаны значения его максимальной антигемолитической активности в разных средах. Данные представлены в табл. 1.

Таблица 1.
Значения максимальной антигемолитической активности (AG_{max}) ХПР в условиях гипотонического стресса эритроцитов в различных средах при 37°C

Среда	AG_{max} , %	
	20 мин	40 мин
NaCl	59 ± 11	$41^* \pm 10$
KCl	64 ± 11	$44^* \pm 11$
LiCl	$25^{**} \pm 9$	$8^{***} \pm 6$

* – $P < 0,05$ в сравнении с контролем, ** – $P < 0,05$ в сравнении с 20 мин.

Видно, что во всех изучаемых средах эффективность ХПР в условиях гипотонического лизиса зависит от продолжительности инкубации клеток в изотонических условиях и достоверно ниже при длительной инкубации клеток (40 мин). ХПР проявляет высокую антигемолитическую активность при гипотоническом повреждении эритроцитов в средах, содержащих NaCl и KCl, причём достоверных отличий в этом случае не выявлено. В то же время антигемолитическая активность ХПР снижается более чем в 2 раза в Li^+ -содержащей среде.

Таким образом, эффективность ХПР при гипотоническом лизисе эритроцитов в K^+ - и Na^+ -содержащих средах гораздо выше, чем в Li^+ -содержащей среде, при этом его антигемолитическая активность зависит от продолжительности инкубации клеток на этапе, предшествующем гипотоническому стрессу. Таким образом, ХПР позволяет выявить отличия в состоянии эритроцитарной мембраны, обусловленные как различным катионным составом, так и различной продолжительностью инкубирования клеток при 37°C в изотонических условиях.

Обсуждение

При помещении клеток в гипотонические условия наблюдается их набухание в результате поступления воды в клетку. Набухание клеток происходит до определённого предела – достижения клеткой критического гемолитического объёма, после чего наблюдается их лизис. Можно полагать, что в Li^+ -содержащей среде клетки быстрее достигают критического гемолитического объёма, поэтому лизис наблюдается в средах, содержащих более высокие концентрации соли, по сравнению с K^+ - и Na^+ -содержащими средами. Так, авторы работы (Lieber, Steck, 1982) показали, что двухвалентные катионы снижают скорость образования поры. Одновалентные катионы различаются по своим физико-химическим свойствам. Так, катионы калия являются хаотропами, очень слабогидратированными ионами, в то время как катион натрия связывает 0,22 молекул воды, а лития – 0,58 молекул воды. Таким образом, Li^+ является самым гидратированным в ряду $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+$. Здесь можно провести аналогию с результатами, которые показывают, что Li^+ -содержащая среда оказывается наиболее неблагоприятной для клеток (Collins, 2006). Вероятно, что наблюдаемые особенности гипотонического повреждения эритроцитов в средах разного состава, а именно более выраженное повреждение клеток в Li^+ -содержащей среде, может быть обусловлено физико-химическими особенностями данного катиона.

Известно, что ХПР протектирует эритроциты от повреждения при различных стрессовых воздействиях: при осмотических стрессах (гипотоническом (Hagerstrand, Isomaa, 1991), гипертоническом (Орлова, 2001; Шпакова, 1988; Шпакова и др., 1995), постгипертоническом (Ніпот, 1997), холодовом шоке (Орлова, 2001; Шпакова, 1988), а также лизисе клеток, вызванном действием порообразующих агентов (Rudenko, Nipot, 1996)). Молекулы ХПР, несущие положительный заряд, встраиваются во внутренний монослой мембраны, взаимодействуя с отрицательно заряженным фосфатидилсеринном (Eskelinen, Saukko, 1984). Существует точка зрения, что местами связывания ХПР в мембране могут быть и кислые полифосфоинозитидные липиды (Chen et al., 2003). Существует предположение (Miseta et al., 1995), что встраивание амфифилов в эритроцитарную мембрану инициирует быстрый выход ионов K^+ в гипотоническую среду, что сглаживает различия в осмотическом давлении между клеткой и средой, препятствуя гемолизу эритроцитов. Часто предполагают (Seeman, 1966, 1972), что защитный эффект ХПР при гипотоническом лизисе связан с повышением значения критического гемолитического объёма при встраивании амфифила в мембрану. Однако это противоречит экспериментам, где было показано, что различные антигемолитические амфифилы могут уменьшать или не влиять на величину критического гемолитического объёма (Beresford, Fastier, 1980; Eskelinen, Saukko, 1984). Эти работы показывают, что увеличенный критический гемолитический объём при встраивании амфифилов в бислой не является главным механизмом, который объясняет амфифил-индуцированный антигемолиз.

Полученные нами данные позволяют говорить о зависимости проявления эффективности вещества от предыстории клетки. По-видимому, в мембране эритроцитов в изотонических условиях (при 37°C) развиваются некие время-зависимые процессы, которые модифицируют встраивание молекул ХПР в мембрану эритроцитов, находящихся в гипотонической среде, в итоге приводящие к изменению эффективности вещества, особенно выраженное в Li^+ -содержащей среде. Основываясь на полученных нами данных при 20, 40 мин инкубации при 37°C , можно говорить о зависимости проявления эффективности вещества от предыстории клетки.

Таким образом, проявление антигемолитической активности хлорпромазина зависит от времени инкубации клеток в физиологической среде и катионного состава гипотонической среды. Применение ХПР может являться тестом на состояние эритроцитарной мембраны.

Список литературы

- Ершов С.С., Ніпот Е.Е., Зуева В.Н. Сравнительный анализ чувствительности эритроцитов млекопитающих к изменению осмотических условий среды // 9-я международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино, 2005. – С. 161–162
- Ніпот О.Є. Вивчення механізмів пошкодження еритроцитів при дегідратації–регідратації і дії деяких літичних пептидів. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Харків, 1997. – 24с.
- Орлова Н.В. Вплив амфіфільних сполук на осмотичну і температурну чутливість еритроцитів. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Харків, 2001. – 18с.
- Шпакова Н.М. Действие криопротекторов и амфипатических соединений на состояние эритроцитов, подвергнутых холодovому и осмотическому шоку. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1988. – 16с.
- Шпакова Н.М., Панталер Е.Р., Бондаренко В.А. Антигемолитический эффект хлорпромазина при гиперосмотическом и холодovом шоке эритроцитов // Биохимия. – 1995. – Т.60, №10. – С. 1624–1631.
- Ямайкина И.В., Черницкий Е.А. Термогемолиз эритроцитов в диапазоне температур, включающих физиологические (аутогемолиз) // Биофизика. – 1991. – Т.34, №4. – Р. 656–659.

- Beresford R.A., Fastier F.N. Effects of some S-alkylthiuroniums and related compounds on the osmotic fragility and the membrane expansion of human erythrocyte // Br. J. Pharmacol. – 1980. – Vol.71. – P. 253–258.
- Chen J.Y., Brunauer L.S., Chu F.C. et al. Selective amphipathic nature of chlorpromazine binding to plasma membrane bilayers // Biochim. Biophys. Acta. – 2003. – Vol.1616, №1. – P. 95–105.
- Collins K.D. Ion hydration: implications for cellular function, polyelectrolytes and protein crystallization // Biophysical chemistry. – 2006. – Vol.119. – P. 271–281.
- Eskelinen S., Saukko P. The hypotonic hemolysis and the protective action of lysophosphatidylcholine // Biorheology. – 1984. – Vol.21. – P. 363–377.
- Gershfeld N.L., Murayama M. Thermal instability of red blood cell membrane bilayers: temperature dependence of hemolysis // J. Membr. Biol. – 1988. – Vol.101, №1. – P. 67–72.
- Hagerstrand H., Isomaa B. Amphiphile-induced antihaemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation // Chem.-Biol. Inter. – 1991. – Vol.79. – P. 335–347.
- Lieber M.R., Steck T.L. Dynamics of the holes in human erythrocyte membrane ghosts // Journal of biological chemistry. – 1982. – Vol.257. – P. 11660–11666.
- Miseta A., Bogner P., Szarka A. et al. Effect of non-lytic concentrations of Brij series detergents on the metabolism-independent ion permeability properties of human erythrocytes // Biophysical journal. – 1995. – Vol.69. – P. 2563–2568.
- Rudenko S.V., Nipot E.E. Protection by chlorpromazine, albumin and bivalent cations against haemolysis induced by melittin [Ala-14] melittin and whole bee venom // Biochem. J. – 1996. – Vol.317. – P. 747–754.
- Seeman P.A. A method for distinguishing specific from nonspecific hemolysis // Biochem. Pharmacol. – 1966. – Vol.15. – P. 1767–1774.
- Seeman P. The membrane actions of anaesthetics and tranquilizers // Pharmacol. Rev. – 1972. – Vol.24. – P. 583–655.

Антигемолітична активність хлорпромазину в умовах гіпотонічного лізису еритроцитів в середовищах різного катіонного складу
К.В.Маркова, О.А.Олійник, Н.М.Шпакова

Провели дослідження гіпотонічного лізису еритроцитів в середовищах, що містять NaCl, KCl, LiCl. Показали, що гіпотонічний лізис еритроцитів починає розвиватися в середовищі, що містить Li⁺, при вищих концентраціях солі, ніж в середовищах, які містять Na⁺ і K⁺. Крім того, показали, що хлорпромазин гірше захищає еритроцити, заздалегідь проінкубовані 40 хв., від гіпотонічного пошкодження в порівнянні з еритроцитами, які були проінкубовані 20 хв. При цьому антигемолітична активність хлорпромазину найменша в середовищі, що містить Li⁺.

Ключові слова: *еритроцити, гіпотонічний лізис, хлорпромазин, катіони Na⁺, K⁺, Li⁺.*

Antihemolytic activity of chlorpromazine in the conditions of hypotonic lysis of erythrocytes in the mediums of different cationic composition
K.V.Markova, O.A.Oleinyk, N.M.Shpakova

The hypotonic lysis of erythrocytes in mediums containing NaCl, KCl, LiCl has been studied. It has been shown that the hypotonic lysis of erythrocytes began to develop in Li⁺-containing medium at more high concentrations of salt on comparison to Na⁺- and K⁺-containing mediums. In addition, it has been shown that a chlorpromazine worse protected erythrocytes preliminary incubated 40 min from the hypotonic damage as compared to erythrocytes preliminary incubated 20 min. Besides antihemolytic activity of chlorpromazine is the least in Li⁺-containing medium.

Key words: *erythrocytes, hypotonic lysis, chlorpromazine, cations Na⁺, K⁺, Li⁺.*

Представлено Г.Ф.Жегуновим
 Рекомендовано до друку В.А.Бондаренком