

УДК: 577.352.4:57.085

Влияние амфифильных соединений на гипертонический стресс эритроцитов человека и быкаН.А.Писаренко¹, Н.М.Шпакова², Н.В.Орлова²¹Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАНУ (Харьков, Украина)

Изучалось влияние амфифильных соединений на чувствительность эритроцитов человека и быка к переносу в 4,0 М NaCl. В работе использовались представители анионных, катионных и неионных амфифилов. Обнаружено, что все используемые вещества снижают уровень гипертонического повреждения клеток обоих видов, причем их эффект более выражен при температуре 37°C. В указанных условиях наиболее эффективными являются заряженные амфифилы (децилсульфат натрия, трифторперазин). При 0°C исследуемые вещества проявляют примерно одинаковую антигемолитическую активность в условиях гипертонического шока эритроцитов человека, в то время как в случае эритроцитов быка защитного действия амфифилов не выявлено.

Ключевые слова: *гипертонический стресс, эритроциты человека и быка, амфифильные соединения.*

Введение

Гипертонический стресс является моделью, с помощью которой можно исследовать один из основных факторов повреждения клеток при замораживании, а именно влияние высококонцентрированных растворов солей, образующихся в результате кристаллизации воды. Гипертонический стресс эритроцитов представляет собой явление повреждения клеток, перенесенных в гипертоническую среду при постоянных положительных значениях температуры (Поздняков, 1989). Одним из способов повышения устойчивости эритроцитов человека к изменению осмотических условий среды является применение различных амфифильных соединений (Дунаевская, Шпакова, 1997; Шпакова и др., 2002, 1995; Hagerstrand, Isomea, 1991). Представляло интерес исследовать эффективность амфифильных соединений при гипертоническом стрессе эритроцитов быка.

Цель работы: провести сравнительное изучение влияния представителей различных классов амфифильных соединений на чувствительность эритроцитов человека и быка к гипертоническому стрессу (4,0 М NaCl).

Объекты и методы исследования

Для исследования использовали эритроциты, полученные из цельной крови человека и быка, заготовленной на глюцицировом консерванте. Гипертонический шок эритроцитов осуществляли переносом клеток в раствор, содержащий 4,0 М NaCl, 10мМ фосфатный буфер, рН 7,4 на 5 мин (конечный гематокрит 0,4%). Количество вышедшего в супернатант гемоглобина определяли спектрофотометрически при длине волны 543 нм. За 100% принимали поглощение пробы, в которую добавляли детергент тритон X-100 в концентрации 0,1%. Амфифильное вещество добавлялось в гипертоническую среду перед внесением в нее клеток (Шпакова и др., 1995).

Значение максимальной антигемолитической активности (АГ_{max}) амфифильного соединения рассчитывали по формуле:

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

где k – величина гемолиза эритроцитов при отсутствии амфифильного вещества; а – минимальная величина гемолиза эритроцитов в присутствии амфифильного вещества.

Все используемые в работе реактивы имели квалификацию «хч» или «чда». Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента–Фишера.

Результаты и обсуждение

Для изучения гипертонической чувствительности эритроцитов человека и быка клетки переносили в среду, содержащую 4,0 М NaCl. Известно, что в этой среде при температуре 37°C наблюдается достаточно высокий уровень лизиса как эритроцитов человека, так и клеток быка (80–

90 %) (Ершов и др., 2004; Поздняков, 1989). Показано, что амфифильные соединения повышают устойчивость эритроцитов человека к различным стрессовым факторам (Шпакова и др., 1995; Hagerstrand, Isomea, 1991; MacDonald, 1986; Rudenko, Nipot, 1996). В данной работе использовали амфифильные соединения, относящиеся к разным классам поверхностно-активных веществ (Елисеев, Кучер, 1991; Ставская, 1981). Анионные амфифилы представлены децилсульфатом натрия (С10), катионные – производным фенотиазина, трифторперазином (ТФП), неионные амфифилы – додецил- β ,D-мальтозидом (ДМ).

Для всех исследуемых амфифильных веществ были сняты концентрационные зависимости гипертонического гемолиза эритроцитов человека и бика в среде, содержащей 4,0 М NaCl, при температуре 37 и 0°C. Характерные кривые зависимости гипертонического гемолиза от концентрации ТФП в среде представлены на рис. 1. На данных кривых можно выделить три фазы. При увеличении концентрации амфифила происходит постепенное снижение уровня лизиса клеток, затем кривая выходит на плато, и в дальнейшем наблюдается повышение уровня повреждения клеток до исходного уровня и выше. Размеры плато отражают диапазон концентраций амфифильного вещества (эффективные концентрации), в пределах которых наблюдается минимальный лизис клеток. Из рис. 1а видно, что при температуре 37°C для эритроцитов человека плато охватывает диапазон 50–60 мкМ, в то время как при температуре 0°C оно сдвигается в сторону меньших значений и составляет 20–30 мкМ. Кроме того, исходный уровень повреждения при температуре 0°C ниже, чем при 37°C.

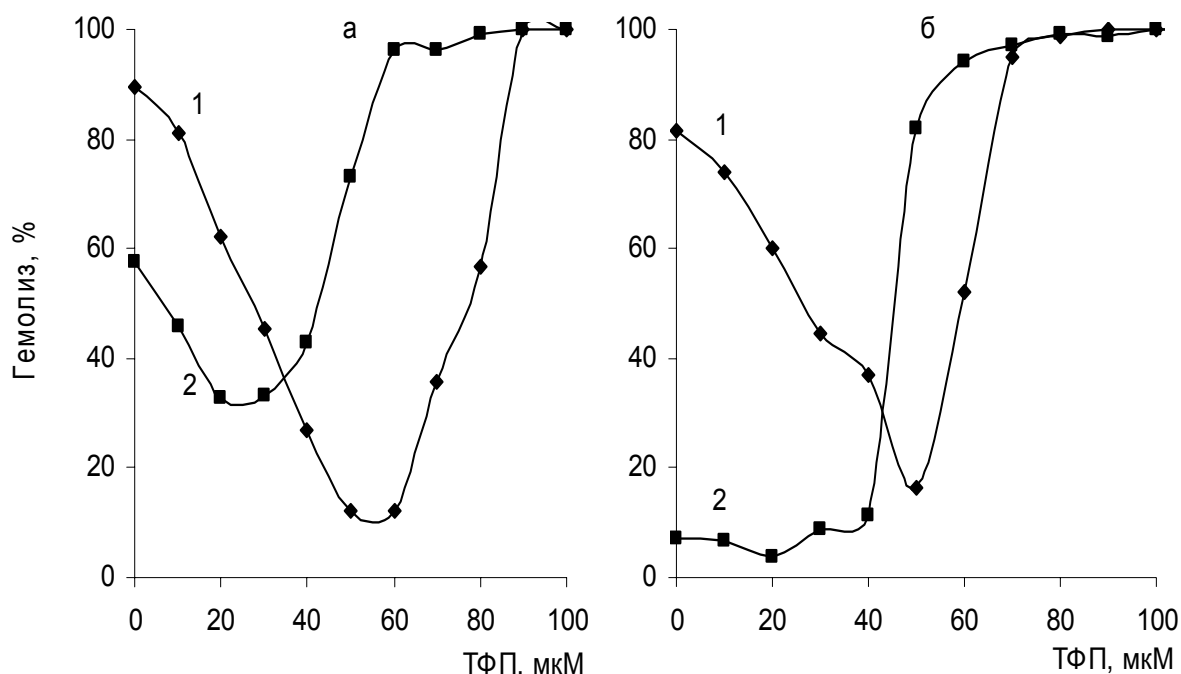


Рис. 1. Влияние трифторперазина на гипертонический стресс эритроцитов человека (а) и бика (б) при температуре 37°C (1) и 0°C (2)

На рис. 1б представлена аналогичная зависимость для эритроцитов бика. Видно, что при 37°C для эритроцитов бика кривая не имеет выраженного плато, а минимальный гемолиз достигается при тех же эффективных концентрациях ТФП, что и для клеток человека. При снижении температуры начальный уровень гипертонического гемолиза эритроцитов бика резко падает и составляет не более 10%. По мере увеличения концентрации амфифила до 40 мкМ сохраняется низкий уровень повреждения клеток с последующим резким возрастанием гемолиза эритроцитов бика.

Аналогичные кривые были получены и для других амфифильных соединений (С10, ДМ). Из полученных зависимостей были рассчитаны антигемолитическая активность, эффективная концентрация (концентрация, соответствующая середине плато) и концентрация вещества, при которой наблюдается 50%-ная антигемолитическая активность вещества при гипертоническом стрессе эритроцитов.

Данные для эритроцитов человека представлены в табл. 1. Видно, что для эритроцитов человека наибольшей антигемолитической активностью обладают ТФП и С10. Несколько меньшее защитное действие оказывает ДМ. Эффективные концентрации данных веществ для клеток можно расположить в порядке убывания в ряду: ТФП>С10>ДМ. Данная последовательность сохраняется и для концентраций, при которых наблюдается 50%-ное снижение уровня гипертонического лизиса клеток. Для всех используемых веществ наблюдается небольшое по протяженности плато, за исключением С10, для которого плато охватывает диапазон в 30 мкМ.

Таблица 1.

Значения максимальной антигемолитической активности ($АГ_{max}$), эффективных концентраций ($С_{АГ_{max}}$), концентраций, при которых наблюдается 50%-ная антигемолитическая активность вещества ($С_{АГ_{50\%}}$) и размеров плато амфифильных соединений при гипертоническом шоке эритроцитов человека в среде, содержащей 4М NaCl при температуре 37 и 0°С

Амфифилы	$АГ_{max}$, %		$С_{АГ_{max}}$, мкМ		$С_{АГ_{50\%}}$, мкМ		Размер плато, мкМ	
	37°С	0°С	37°С	0°С	37°С	0°С	37°С	0°С
С 10	86±3	51±3	45±4	10±0	5±2	5±2	30–60±4	10±0
ДМ	76±4	47±2	8±1	2±0	2±1	1±0	6–10±1	2±0
ТФП	94±2	42±9	55±6	25±6	25±7	10±2	50–60±7	20–30±9

Все используемые амфифилы защищают эритроциты человека от гипертонического повреждения и при температуре 0°С, однако в значительно меньшей степени, чем при 37°С. Антигемолитическая активность амфифилов при снижении температуры в среднем падает на 30–50 % и для всех используемых веществ находится в диапазоне 40–50 %. Таким образом, снижение температуры снимает различия в эффективности действия амфифильных веществ на эритроциты человека. При этом эффективные концентрации, при которых наблюдается минимальный лизис клеток, сдвигаются в сторону меньших значений, однако последовательность их расположения сохраняется той же, что и при 37°С (ТФП>С10>ДМ). При низкой температуре для ТФП плато более короткое и сдвинуто в сторону меньших значений концентраций, в то время как для С10 и ДМ нет выраженного плато, и минимальный гемолиз регистрируется в области 10мкМ и 2мкМ соответственно. Гипертоническое повреждение эритроцитов связывают с формированием мембранных дефектов вплоть до образования гемолитических пор (Белоус, Грищенко, 1994). В основе механизма защитного действия амфифильных веществ, по-видимому, лежит способность их молекул встраиваться в мембрану и инициировать процессы, которые препятствуют формированию мембранных макроскопических пор. Наиболее вероятно, что антигемолитическое действие амфифилов связано с временным «разупорядочиванием» мембраны (флип-флоп липидов и (или) образование временных небислойных фаз) (Орлова, 2001). Известно, что понижение температуры до 0°С является фактором, «уплотняющим» структуру мембраны (Белоус, Грищенко, 1994). При температурах, близких к 0°С, в мембране происходит «низкотемпературная усадка липидов», когда молекулы сближаются в латеральной плоскости мембраны и изменяется агрегатное состояние мембранного цитоскелета (Белоус, Грищенко, 1994). В этой ситуации падение эффективности амфифильных веществ обусловлено снижением их пертурбирующего действия в условиях достаточно жесткой мембраны и, как следствие, уменьшением способности предотвращать образование мембранных макроскопических пор.

Результаты, полученные для эритроцитов быка, представлены в табл. 2. В данном случае максимальным защитным действием в условиях гипертонического шока обладают ТФП и С10 (80%), а эффективность ДМ несколько ниже (65%). Эффективные концентрации веществ для эритроцитов быка выше, чем для эритроцитов человека, за исключением ТФП, эффективные концентрации которого совпадают для клеток обоих видов. Эффективные концентрации веществ и концентрации, при которых достигается 50%-ное снижение уровня лизиса клеток, в порядке убывания можно расположить в ряду: С10>ТФП>ДМ. Кроме того, для эритроцитов быка характерно либо незначительное плато (С 10), либо точечное (ДМ, ТФП). Возможно, такое узкое плато связано с особенностями структуры плазматических мембран эритроцитов быка, которые, по всей видимости, содержат небольшое количество посадочных мест для молекул амфифила, в результате чего не способны выдерживать встраивание большого количества экзогенных молекул амфифила без деструктивных изменений эритроцитарной мембраны.

При температуре 0°С используемые амфифильные соединения не оказывают защитного эффекта на эритроциты быка в условиях гипертонического шока, в отличие от эритроцитов человека.

Это может быть связано с тем, что при температуре 0°C исходный уровень гипертонического лизиса клеток (в отсутствии амфифильных веществ) очень низок (не более 10%), т.е. сам факт снижения температуры оказывает защитное действие на эритроциты быка.

Таблица 2.

Значения максимальной антигемолитической активности (AG_{max}), эффективных концентраций (C_{AGmax}), концентраций, при которых наблюдается 50%-ная антигемолитическая активность вещества ($C_{AG50\%}$) и размеров плато амфифильных соединений при гипертоническом шоке эритроцитов быка в среде, содержащей 4M NaCl при температуре 37 и 0°C

Амфифилы	AG_{max} , %		C_{AGmax} , мкМ		$C_{AG50\%}$, мкМ		Размер плато, мкМ	
	37°C	0°C	37°C	0°C	37°C	0°C	37°C	0°C
С 10	83±5	–	60±6	–	35±4	–	60–70±7	–
ДМ	65±5	–	14±3	–	10±4	–	14±2	–
ТФП	80±7	–	50±3	–	25±5	–	50±3	–

Выводы

1. Все используемые амфифильные соединения снижают уровень гипертонического повреждения клеток обоих видов, причем их эффект более выражен при температуре 37°C.
2. При температуре 37°C наиболее эффективными являются заряженные амфифильные соединения (ТФП, С10) как в случае эритроцитов человека, так и в случае эритроцитов быка.
3. При 0°C для эритроцитов человека все используемые амфифильные соединения проявляют примерно одинаковую эффективность, в то время как для эритроцитов быка в этих условиях защитного эффекта веществ не наблюдается.

Список литературы

- Белоус А.М., Грищенко В.И. Кробиология. – Киев: Наук. думка, 1994. – 432с.
- Дунаевская О.И., Шпакова Н.М. Защитный эффект трифторперазина при гипертоническом шоке эритроцитов // Укр. биохим. журн. – 1997. – №2. – С. 30–34.
- Елисеев С.А., Кучер Р.В. Поверхностно-активные вещества и биотехнология. – Киев: Наукова думка, 1991. – 115с.
- Ершов С.С., Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Чувствительность эритроцитов млекопитающих к изменению температурных и осмотических условий среды // Пробл. кробиологии. – 2004. – №3. – С. 51–57.
- Орлова Н.В. Влияние амфифильных соединений на осмотическую и температурную чувствительность эритроцитов. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Харьков, 2001. – 18с.
- Поздняков В.В. Влияние состава и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к осмотическому к температурному шоку. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1989. – 16с.
- Ставская С.С. Биологическое разрушение анионных ПАВ. – Киев: Наук. думка, 1981. – 114с.
- Шпакова Н.М., Дунаевская О.Н., Сынчикова О.П., Бондаренко В.А. Действие трифторперазина на гемолиз эритроцитов в гипертонических растворах электролитов // Пробл. кробиологии. – 2002. – №3. – С. 7–15.
- Шпакова Н.М., Панталер Е.Р., Бондаренко В.А. Антигемолитический эффект хлорпромазина при гипертоническом и холодовом шоке эритроцитов // Биохимия. – 1995. – Т.60, №10. – С. 1624–1631.
- Hagerstrand H., Isomea B. Amphiphile-induced antihemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation // Chem.-Biol.Inter. – 1991. – Vol.79. – P. 335–347.
- MacDonald R.I. Trifluoperazine inhibits Sendai virus-induced hemolysis // Biochim. Biophys. Acta. – 1986. – Vol.856, №2. – P. 337–348.
- 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.

Вплив амфифільних сполук на гіпертонічний стрес еритроцитів людини і бика Н.А.Писаренко, Н.М.Шпакова, Н.В.Орлова

Вивчався вплив амфифільних сполук на чутливість еритроцитів людини і бика до переносу в 4,0 M NaCl. У роботі використані представники аніонних, катіонних та неіонних амфифілів. Встановлено, що усі використані речовини знижують рівень гіпертонічного ушкодження клітин обох видів, причому їх ефект більш значний при температурі 37°C. У зазначених умовах

найбільш ефективними є заряджені амфіфіли (децилсульфат натрію, трифторперазин). При 0°C досліджувані сполуки проявляють приблизно однакову антигемолітичну активність в умовах гіпертонічного стресу еритроцитів людини, у той час як у випадку еритроцитів бика захисного ефекту амфіфілів не виявлено.

Ключові слова: *гіпертонічний стрес, еритроцити людини та бика, амфіфільні сполуки.*

Effect of amphiphilic compounds on hypertonic stress of human and bovine erythrocytes
N.A.Pisarenko, N.M.Shpakova, N.V.Orlova

Effect of amphiphilic compounds on sensitivity of human and bovine erythrocytes to the transfer into 4,0 M NaCl has been studied. In the paper there were used derivatives of anion, cation and non-ionic amphiphils. All used substances have been found to reduce the level of hypertonic damage of cell of both types, moreover their effect is the most manifested at 37°C. Under mentioned conditions charged amphiphils (sodium decylsulphate, trifluorperazine) are the most effective. At 0°C the studied substances manifest approximately the same anti-hemolytic activity at hypertonic shock of human erythrocytes meanwhile at hypertonic hemolysis of bovine erythrocytes no protective effect of amphiphils is observed.

Key words: *hypertonic stress, human and bovine erythrocytes, amphiphilic compounds.*

Представлено М.Г.Кокодієм
Рекомендовано до друку В.А.Бондаренком