

УДК: 573.356.612.111

**Влияние температуры литической среды на антигемолитическую активность амфифильных веществ в условиях гипертонического стресса эритроцитов человека**  
Н.В.Орлова

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

Изучали антигемолитическую активность амфифильных соединений в условиях гипертонического стресса (4,0 М NaCl) эритроцитов человека при температуре литической среды 37°C и сравнивали с полученными ранее результатами при 0°C. Эритроциты переносили из среды, содержащей 0,15 или 0,7 М NaCl при 0°C, в среду, содержащую 4,0 М NaCl при 37°C. Величины антигемолитической активности амфифильных веществ зависели от температуры литической среды. В условиях гипертонического стресса эритроцитов значения максимальной антигемолитической активности амфифильных соединений выше при температуре литической среды 37°C, чем при 0°C.

**Ключевые слова:** *гипертонический стресс, эритроциты, амфифильные соединения, антигемолитическая активность, температура литической среды.*

**Вплив температури літичного середовища на антигемолітичну активність амфифільних сполук в умовах гіпертонічного стресу еритроцитів людини**  
Н.В.Орлова

Вивчали антигемолітичну активність амфифільних сполук в умовах гіпертонічного стресу (4,0 М NaCl) еритроцитів людини при температурі літичного середовища 37°C і порівнювали з результатами при 0°C, які були отримані раніше. Еритроцити були перенесені із середовища, що містить 0,15 або 0,7 М NaCl при 0°C, у середовище, що містить 4,0 М NaCl при 37°C. Величини антигемолітичної активності амфифільних сполук залежали від температури літичного середовища. В умовах гіпертонічного стресу еритроцитів значення максимальної антигемолітичної активності амфифільних сполук є більш вищі при температурі літичного середовища 37°C, ніж при 0°C.

**Ключові слова:** *гіпертонічний стрес, еритроцити, амфифільні сполуки, антигемолітична активність, температура літичного середовища.*

**Influence of lytic medium temperature on antihemolytic activity of amphiphilic compounds under hypertonic stress of human erythrocytes**  
N.V.Orlova

Comparative analysis of antihemolytic activity of amphiphilic compounds under conditions of hypertonic stress of human erythrocytes at temperature of lytic medium 0 and 37°C was carried out. Erythrocytes were transferred from medium 0.15 or 0.7 M NaCl at 0°C to medium 4.0 M NaCl at 37°C. The values of antihemolytic activity of amphiphilic compounds depended on temperature of lytic medium. The values of maximal antihemolytic activity of amphiphilic compounds are higher at temperature of lytic medium of 37°C than of 0°C under conditions of hypertonic stress of erythrocytes.

**Key words:** *hypertonic stress, erythrocytes, amphiphilic compounds, antihemolytic activity, temperature of lytic medium.*

**Введение**

Гипертонический стресс эритроцитов моделирует состояние клеток при действии на них высококонцентрированных растворов солей, образующихся в результате вымораживания воды в условиях криоконсервирования биологических объектов.

Известно, что при перенесении эритроцитов человека в раствор, содержащий 4,0 М NaCl, при 37°C наблюдается гемолиз на уровне 80–90 % (Шпакова и др., 1995). Присутствие амфифильных соединений в литической среде приводит к снижению уровня гипертонического гемолиза эритроцитов (Шпакова и др., 1995). В то же время, предварительное инкубирование клеток в растворе, содержащем 0,45 М NaCl, позволяет значительно снизить повреждение эритроцитов в 4,0 М NaCl (Поздняков, Бондаренко, 1989).

Следует отметить, что инкубирование в 0,7 М NaCl формирует метастабильное состояние эритроцитов, проявляющееся в высоком уровне гемолиза в 4,0 М NaCl (Орлова, Шпакова, 2003). В этих условиях амфифильные соединения также способны проявлять антигемолитическую активность

(Орлова, Шпакова, 2003). Известно, что в условиях гипертонического стресса эритроцитов антигемолитическая активность амфифильных соединений меньше при 0°C, чем при 37°C (Орлова, Шпакова, 2004). В указанных экспериментальных условиях и предварительную инкубацию, и собственно гипертонический лизис эритроцитов осуществляли при одной и той же температуре – 37 или 0°C. Остается неясным, низкая температура среды предварительной инкубации клеток или литической среды играет основную роль в снижении антигемолитической активности амфифильных веществ. Для того чтобы ответить на этот вопрос, представляло интерес исследовать антигемолитическую активность амфифильных соединений в условиях гипертонического стресса эритроцитов при изменении температуры одной из сред инкубации.

Цель работы – исследовать эффективность амфифильных соединений в условиях гипертонического стресса (4,0 М NaCl при 37°C) эритроцитов, перенесенных из сред предварительной инкубации, имеющих температуру 0°C.

#### Объекты и методы исследования

В работе были использованы представители катионных, неионных, цвиттерионных и анионных классов мицеллообразующих амфифильных соединений: хлорпромазин гидрохлорид (ХП), додецил-β, D-мальтозид (ДМ), 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфонат натрия (Z16) (фирма «Calbiochem») и децилсульфат натрия (С10) (фирма «Синтезпав») соответственно. Эритроциты получали из крови II-ой группы доноров-мужчин по общепринятой методике. Все используемые среды готовили на 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,4.

Гипертонический стресс эритроцитов осуществляли следующим образом. С помощью поршневого дозатора (Gilson) эритроциты переносили в среду, содержащую 0,15 или 0,7 М NaCl, при 0°C и инкубировали 2 мин, затем переносили в раствор, содержащий 4,0 М NaCl, при температуре 37°C на 5 мин (гематокрит 0,4%). Амфифильное вещество добавляли в литическую среду перед внесением клеток (Шпакова и др., 1995). Количество гемоглобина в супернатанте определяли спектрофотометрически при длине волны 543 нм. Выход гемоглобина из клеток рассчитывали в процентах по отношению к 100%-му гемолизу эритроцитов в присутствии тритона X-100 (0,1%).

Эффективную концентрацию амфифильного вещества рассчитывали как среднее арифметическое концентраций данного вещества, соответствующих минимальному значению гемолиза эритроцитов в серии опытов одного эксперимента. Значение максимальной антигемолитической активности ( $АГ_{max}$ ) амфифильного соединения представляет собой среднюю арифметическую величину из значений максимальной антигемолитической активности данного соединения, рассчитанных по формуле:

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

k – величина гемолиза эритроцитов в данных экспериментальных условиях в отсутствие амфифильного вещества;

a – минимальная величина гемолиза эритроцитов в присутствии амфифильного вещества.

Исследовали эритроциты 6 доноров в 2-х параллельных пробах. Результаты анализировали с помощью критерия Mann-Whitney и ANOVA.

#### Результаты

Было изучено влияние амфифильных соединений, относящихся к различным классам, на гипертонический гемолиз эритроцитов человека. Эритроциты инкубировали при 0°C в физиологическом растворе или в среде, содержащей 0,7 М NaCl, а затем переносили в среду, содержащую 4,0 М NaCl и амфифильное вещество при 37°C. Из полученных зависимостей уровней гипертонического гемолиза клеток от концентраций амфифильных соединений (рис. 1) были рассчитаны величины максимальной антигемолитической ( $АГ_{max}$ ) активности и значения эффективных концентраций веществ. Указанные величины представлены в таблицах. Для сравнения приведены ранее полученные данные по эффективности амфифильных соединений (Орлова, Шпакова, 2004) в условиях гипертонического стресса эритроцитов при 0°C.

Из представленных в табл. 1 данных видно, что в условиях гипертонического стресса эритроцитов при изотермическом режиме (0→0°C) амфифильные соединения проявляют  $АГ_{max}$  активность на уровне 15–63%. Изменение температуры литической среды (37°C) позволяет существенно повысить эффективность всех амфифильных соединений примерно на 30%. Следует отметить, что в обоих случаях вещества можно расположить в ряду по возрастанию значений их  $АГ_{max}$  активности: Z16 < ДМ < С10 < ХП. В такой же последовательности возрастают и значения эффективных концентраций амфифильных соединений.

В работе (Орлова, Шпакова, 2003) показано, что неионный ДМ и катионный ХП не способны

снижать повреждение эритроцитов, перенесенных из 0,7 М в 4,0 М NaCl при 0°C. Для анионного С10 и цвиттерионного Z16 отмечено незначительное (примерно 10%) снижение гипертонического гемолиза эритроцитов.

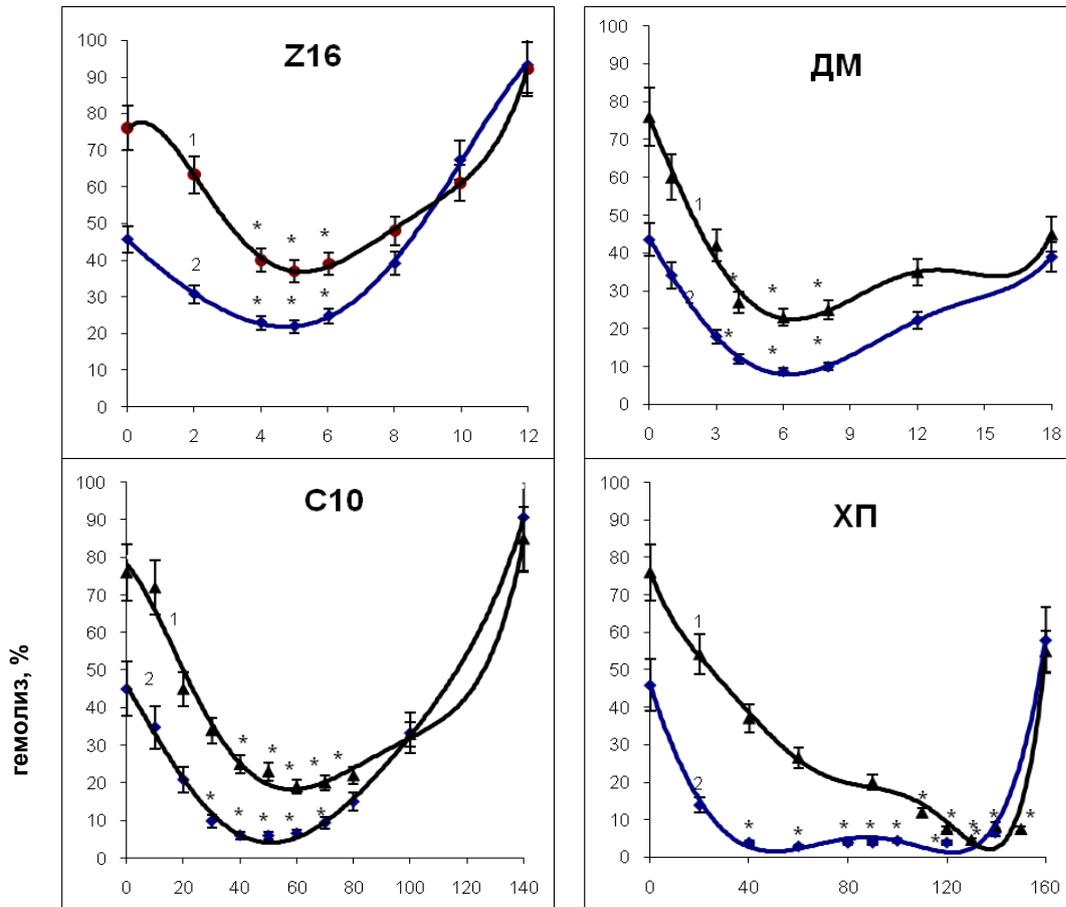


Рис. 1. Влияние амфифильных соединений на уровень гемолиза эритроцитов, перенесенных в раствор 4,0 М NaCl (37°C) после предварительной инкубации в среде, содержащей 0,15 (1) или 0,7 (2) М NaCl при 0°C; \* – различия между величинами не достоверны при  $P < 0,05$

Таблица 1.

Значения эффективных концентраций и максимальной антигемолитической активности ( $АГ_{max}$ ) амфифильных веществ при перенесении эритроцитов из 0,15 М NaCl (0°C) в 4,0 М NaCl при 37°C (0→37°C) или при 0°C (0→0°C), ( $M \pm m$ )

Вещество	Эфф. конц., мкМ (0→0°C)	Эфф. конц., мкМ (0→37°C)	$АГ_{max}$ , % (0→0°C)	$АГ_{max}$ , % (0→37°C)
Z16	2	6	15±2	52±6
ДМ	3	6	30±4	64±6
С10	10	60	48±6	75±7
ХП	20	130	63±8	93±10

Примечание: эффективная концентрация в табл. соответствует середине диапазона эффективных концентраций веществ.

Как видно из представленных данных (табл. 2), физиологическая температура литической среды позволяет амфифильным соединениям проявлять высокую  $АГ_{max}$  активность несмотря на то, что клетки были предварительно обезвожены в 0,7 М NaCl при 0°C.

Таблица 2.

Значения эффективных концентраций и максимальной антигемолитической ( $AG_{max}$ ) активности амфифильных соединений при перенесении эритроцитов из 0,7 М NaCl (0°C) в 4,0 М NaCl (37°C), ( $M \pm m$ )

Вещество	Эфф. конц., мкМ (0→37°C)	$AG_{max}$ , %, (0→37°C)
Z16	5	52 ±6
ДМ	6	82* ±8
С10	50	87* ±8
ХП	90	97* ±8

Примечание: эффективная концентрация в табл. соответствует середине диапазона эффективных концентраций веществ; \* – различия между величинами не достоверны при  $P < 0,05$ .

В указанных условиях значения  $AG_{max}$  активности неионного ДМ, анионного С10 и катионного ХП находятся примерно на одном уровне, а эффективность цвиттерионного Z16 несколько ниже. Следует отметить, что в данном случае (табл. 2) величина  $AG_{max}$  активности неионного ДМ заметно выше, чем в аналогичном температурном режиме (0→37 °C) для клеток, перенесенных из 0,15 в 4,0 М NaCl (табл. 1).

Таким образом, при гипертоническом стрессе эритроцитов эффект амфифильных соединений определяется температурой литической среды.

### Обсуждение

В условиях стресса происходит нарушение, в первую очередь, барьерной функции плазматической мембраны для ионов, затем формируются макроскопические поры, через которые крупные молекулы гемоглобина выходят из клетки (Белоус, Грищенко, 1994). Исследуемые амфифильные соединения способны предотвращать формирование макроскопических пор в плазматической мембране. При этом температура является дополнительным фактором, способным влиять на состояние трансмембранных пор (Agner et al., 2000). Физиологическая температура способствует замыканию мембранных пор, а низкая – их стабилизации.

Предварительное инкубирование эритроцитов в среде 0,7 М NaCl при 0°C приводит к формированию метастабильного состояния клеток и выходу из них катионов калия (Белоус, Грищенко, 1994). Перенесение таких метастабильных эритроцитов в среду 4,0 М NaCl при 0°C стабилизирует уже существующие микродефекты и способствует эволюции их в макропоры, не позволяя веществам проявлять антигемолитическую активность (Орлова, Шпакова, 2003).

Действие амфифильных соединений на клетки проявляется на уровне их плазматических мембран. Встраиваясь в эритроцитарную мембрану, амфифильные вещества изменяют форму клеток. Молекулы ХП преимущественно распределяются во внутреннем монослое липидного бислоя мембраны, трансформируя эритроцит из дискоцита в стоматоцит (Ahyayaucha et al., 2006). Молекулы других исследуемых веществ (Z16, ДМ, С10), которые распределяются во внешнем монослое, являются эхиноцитогенными (Кулешова и др., 2001). В низких концентрациях амфифильные вещества протектируют клетки от разных видов стресса (Шпакова и др., 1995; Hagerstrand, Isomaa, 1991), в то время как в высоких концентрациях амфифильные соединения вызывают отщепление везикул от плазматических мембран (Hagerstrand, Isomaa, 1994; Kralj-Iglic et al., 2005) и проявляют детергентные свойства (Rodi et al., 2006).

Авторы работы (Hagerstrand, Isomaa, 1991) полагают, что в основе антигемолитической активности амфифильных веществ лежит их способность временно разупорядочивать мембрану. Если это предположение верно, то чем лабильнее мембрана, тем выше будут значения  $AG_{max}$  активности веществ. Если учесть, что при 37°C мембрана более лабильна, чем при 0°C (Белоус, Грищенко, 1994), то результаты, полученные в данной работе, свидетельствуют в пользу этого предположения. Действительно, повышение температуры литической среды (37°C) позволяет амфифильным веществам эффективнее защищать от гипертонического гемолиза не только метастабильные клетки, но и эритроциты, перенесенные из 0,15 М NaCl. Несмотря на общий характер защитного действия амфифильных соединений, относящихся к разным классам, следует отметить, что эффективность каждого из веществ (значения  $AG_{max}$  активности и эффективных концентраций) определяется физико-химическими особенностями их молекул.

### Список литературы

Белоус А.М., Грищенко В.И. Кробиология. – К.: Наук. думка, 1994. – 432с.  
Кулешова Л.Г., Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Антигемолитическая и трансформирующая активность

амфифильных соединений // Пробл. криобиологии. – 2001. – №1. – С. 9–15.

Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Влияние амфифильных соединений на чувствительность частично обезвоженных эритроцитов к гипертоническому стрессу // Пробл. криобиологии. – 2003. – №1. – С. 59–64.

Орлова Н.В. Шпакова Н.М. Влияние температуры на проявление антигемолитической активности амфифильных соединений в условиях гипертонического стресса эритроцитов // Сб. Актуальные проблемы медицины и биологии. – Киев, 2004. – №1. – С. 181–184.

Поздняков В.В., Бондаренко В.А. Взаимосвязь между исходными осмотическими условиями среды и чувствительностью эритроцитов к гипертоническому стрессу в 4.0 М NaCl // Криобиология. – 1989. – №1. – С. 47–49.

Шпакова Н.М., Панталер Е.Р., Бондаренко В.А. Антигемолитический эффект хлорпромазина при гиперосмотическом и холодовом шоке эритроцитов // Биохимия. – 1995. – Т.60, №10. – С. 1624–1631.

Agner G., Kaulin Y.A., Schagina L.V. et al. Effect of temperature on the formation and inactivation of syringomycin E pores in human red blood cells and bimolecular lipid membranes // Biochim. Biophys. Acta. – 2000. – Vol.1466, №1–2. – С. 79–86.

Ahyayaucha H., Gallego M., Casis O. et al. Changes in erythrocyte morphology induced by imipramine and chlorpromazine // J. Physiol. Biochem. – 2006. – Vol.62, №3. – P. 199–205.

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.

Hagerstrand H., Isomaa B. Lipid and protein composition of exovesicles released from human erythrocytes following treatment with amphiphiles // Biochim. Biophys. Acta. – 1994. – Vol.1190. – P. 409–415.

Kralj-Iglic V., Hägerstrand H., Veranic P. et al. Amphiphile-induced tubular budding of the bilayer membrane // Eur. Biophys. J. – 2005. – Vol.34, №8. – P. 1066–1070.

Rodi P.M., Cabeza M.S., Gennaro A.M. Detergent solubilization of bovine erythrocytes. Comparison between the insoluble material and the intact membrane // Biophys. Chem. – 2006. – Vol.122, №2. – P. 114–122.

---

**Представлено: Г.Ф.Жегуновим**

**Рекомендовано до друку: В.В.Мартиненко**

© Н.В.Орлова, 2009