

Вплив трифторперазину та децилсульфату натрію на осмотичний шок еритроцитів людини та кролика

Н.А. Єршова, О.О. Чабаненко, Н.М. Шпакова, О.Є. Ніпот, Н.В. Орлова

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків; e-mail:nipotel71@gmail.com

Вивчали вплив трифторперазину та децилсульфату натрію на постгіпертонічний шок еритроцитів людини та кролика. Для цього визначали рівень гемолізу при постгіпертонічному шоці та частку іонів калію, що вийшли з еритроцитів в розчинах дегідратації та регідратації за наявності трифторперазину та децилсульфату натрію. Показано, що захисний ефект амфіфільних сполук проявляється при 0°C, але не при 37°C. При цьому знижувався рівень гемолізу у певному концентраційному діапазоні кожної вивчених речовин. Виявлено, що еритроцити людини є більш чутливими до захисної дії вивчених амфіфільних сполук і характеризуються ширшим діапазоном захисних концентрацій. Це може бути пояснено різним ліпідним складом мембран еритроцитів досліджуваних ссавців. Вимірювання виходу іонів калію у середовищах дегідратації і регідратації за наявності амфіфільних сполук дало змогу припустити, що останні не впливають на проникність мембрани еритроцитів ссавців для калію в умовах постгіпертонічного шоку. Виходячи з отриманих результатів та даних літератури передбачається, що механізм захисної дії трифторперазину та децилсульфату натрію полягає не у формуванні тимчасових дефектів проникності для іонів калію, а у збільшенні площі поверхні клітин внаслідок вбудовування молекул амфіфільних сполук. Це призводить до збільшення критичного гемолітичного об'єму еритроцитів та зменшує рівень пошкодження при зміні гіпертонічних умов на ізотонічні.

Ключові слова: еритроцити людини та кролика; постгіпертонічний шок; гемоліз; амфіфільні сполуки; іони калію; проникність мембрани.

ВСТУП

Еритроцити є важливим компонентом крові, що забезпечують увесь організм киснем, потрібним для його життєдіяльності. Тому існує необхідність у розробці ефективних методів зберігання цих клітин, щоб задовольнити значну клінічну потребу. Переливання еритроцитів рятує життя пацієнтів з підвищеною їх втратою при травматичних та хірургічних крововиливах, апластичних та гемолітичних анеміях, гемоглобінопатіях та інших патологічних станах з низькою кисневою забезпеченістю. Хоча методи кріоконсервації еритроцитів, що застосовуються, є задовільними, нові досягнення у розумінні фізіології еритроцитів за умов впливу факторів кріопшкодження та процесу кріозахисту є необхідними. Це дасть змогу створити більш досконалі способи зберігання клітин.

© Н.А. Єршова, О.О. Чабаненко, Н.М. Шпакова, О.Є. Ніпот, Н.В. Орлова

Важливим етапом кріоконсервації клітин є відігрів. Вплив високої концентрації солі, що утворюється при заморожуванні, призводить до ушкодження клітин після відтавання, коли гіпертонічне середовище змінюється на ізотонічне. Це явище має назву постгіпертонічного шоку та вивчається за допомогою відповідної моделі. Сучасні уявлення про постгіпертонічний шок еритроцитів базуються на гіпотезі надлишкового накопичення іонів натрію у внутрішньоклітинному середовищі через їх зв'язування з білковими молекулами [1]. Зв'язані іони не є осмотично активними і створюють умови для додаткового припливу катіонів натрію з позаклітинного розчину. У відповідь на розведення цитоплазми білки звільняють внутрішньоклітинні іони, що зумовлює надходження в клітини надлишку води. В результаті цього еритро-

цити набухають до критичного гемолітичного об'єму і гемолізують у разі перевищення межі пружності мембрани.

Залучення до досліджень процесів кріоконсервації та кріозахисту сполук, що потенційно можуть проявляти захисні властивості щодо клітин, розкриває нові можливості у розумінні механізмів пошкодження і розробці протоколів кріоконсервації. Застосування амфифільних речовин, що здатні впливати на такі характеристики, як площа поверхні, плинність та проникність мембрани, може зменшити рівень лізису та зберегти більшу кількість клітин [2–5]. Раніше була показана ефективність низки амфифільних сполук у зменшенні рівня гіпо- та гіпертонічного гемолізу еритроцитів [4, 6–8]. Тому доцільно було продовжити дослідження щодо постгіпертонічного шоку, використовуючи амфифільні сполуки різного заряду та порівнявши еритроцити людини та тварин, що відрізняються складом мембрани.

Nägerstrand і Isomaa [4] припускають, що захисна дія амфифільних сполук на еритроцити реалізується утворенням тимчасових ефектів проникності. Враховуючи це та загальну їх спроможність неспецифічно впливати на регулювання функції іонних каналів [2] було корисним вивчити проникність еритроцитів ссавців для іонів калію.

Метою нашої роботи було вивчення впливу трифторперазину та децилсульфату натрію на постгіпертонічний шок еритроцитів людини та кролика.

МЕТОДИКА

Для дослідження використовували еритроцити, отримані з донорської крові людини (*Homo sapiens*), кролика (*Oryctolagus cuniculus*), заготовленої на гемоконсерванті «Глюгіцир» («Біофарма», Україна). Кров чоловіків А (II)⁺ групи була надана Харківським обласним центром служби крові, кров кролика – віварієм Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (Харків).

Роботу з тваринами проводили відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах» (V Національний конгрес з біоетики, Київ, 2013), узгоджених з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447–IV від 21.02.2006 р.).

Після видалення плазми еритромасу двічі відмивали центрифугуванням (центрифуга «ОПн-3У4.2», Киргизстан) при 1000g протягом 3 хв у 10-кратному об'ємі фізіологічного розчину (NaCl 0,15 моль/л; Na-фосфатний буфер 0,01 моль/л, рН 7,4). Лейкоцитарну плівку і супернатант видаляли аспірацією після кожного центрифугування. Еритроцити зберігали у вигляді щільного осаду не більше ніж 4 год за 0°C.

Постгіпертонічний шок моделювали перенесенням еритроцитів з гіпертонічного розчину (етап дегідратації, 1,65 моль/л NaCl) в ізотонічний розчин (етап регідратації, 0,15 моль/л NaCl) при 0 та 37°C. Амфифільні речовини додавали у середовище регідратації. Концентрація децилсульфату натрію була 200–1400 моль/л, трифторперазину – 50–300 моль/л. Усі середовища приготовлені на Na-фосфатному буфері (0,01 моль/л, рН 7,4). Вміст гемоглобіну в супернатанті визначали спектрофотометричним методом на СФ-4А з проточною кюветою при довжині хвилі 543 нм і виражали у відсотках щодо 100%-го гемолізу еритроцитів. За 100% приймали поглинання проб, в які додавали детергент тритон Х-100 у концентрації 0,1%.

Кількість іонів калію визначали в надосаді досліджуваної проби (кінцевий гематокрит 4%) за допомогою іонометра ЕВ-74 з використанням іоноселективного електрода Еліс-121К і електрода порівняння ЕВЛ-1М3.1. Відсоток виходу іонів калію визначали відносно 100% гемолізу еритроцитів, який досягався в циклі багаторазового заморожування-відтавання в дистильованій воді.

Результати обробляли методами варіаційної статистики з використанням програм Excel (MS Office) та за допомогою програми «Statistica 6.0» («StatSoft Inc.», США). Значення $P < 0,05$ вважали статистично вірогідними.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

З рис. 1 та 2 видно, що додавання амфифільної речовини у середовище регідратації при 37°C або не впливало на рівень пошкодження еритроцитів ссавців, або призводило до збільшення показників гемолізу. При 0°C проявлявся захисний ефект амфифільних сполук та знижувався рівень гемолізу у певному концентраційному діапазоні кожної з досліджуваних речовин. Так, у разі децилсульфату натрію максимальний захисний ефект спостерігається у діапазоні 200–600 та 400–600 мкмоль/л; у разі трифторперазину 100–200 та 150–200 мкмоль/л для еритроцитів людини та кролика відповідно.

Аналізуючи отримані результати можна відмітити більш виражену захисну дію обох амфифільних речовин при мінімальній досліджуваній концентрації на еритроцити людини порівняно з еритроцитами кролика. Так, у разі децилсульфату натрію рівень

гемолізу знизився у 3,2 та 2,0 раза; трифторперазину – 2,0 та 1,3 раза для еритроцитів людини та кролика відповідно. Різниця у максимальній антигемолітичній активності кожної з досліджуваних речовин є менш вираженою, але тенденція зберігається. При додаванні децилсульфату натрію рівень гемолізу знизився у 3,6 та 3,3 раза; трифторперазину – 3,0 та 2,3 раза для еритроцитів людини та кролика відповідно. Таким чином, можна сказати, що еритроцити людини є більш чутливими до захисної дії досліджуваних амфифільних сполук і характеризуються ширшим діапазоном захисних концентрацій.

Результати щодо виходу калію з еритроцитів людини та кролика у середовищах 0,15 та 1,65 моль/л NaCl представлено в таблиці. Видно, що як трифторперазин, так і додецилсульфат натрію не впливають на вихід калію з клітин людини та кролика в досліджуваних середовищах при 0 та при 37°C .

Вплив амфифільних сполук на мембрани еритроцитів широко вивчений. Але механізми їх дії на клітини залишаються незрозумілими через складність пояснення того, як різні за структурою сполуки викликають подібні ефекти. Існують докази взаємодії

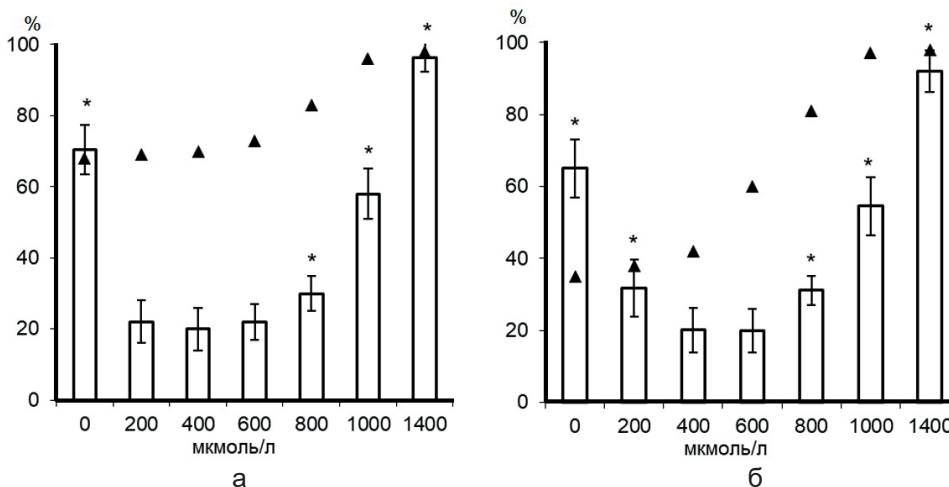


Рис. 1. Вплив децилсульфату натрію на постгіпертонічний гемоліз еритроцитів людини (а) і кролика (б) при 37°C (трикутники) та 0°C (стовпчики). * $P < 0,05$ порівняно з мінімальним значенням гемолізу

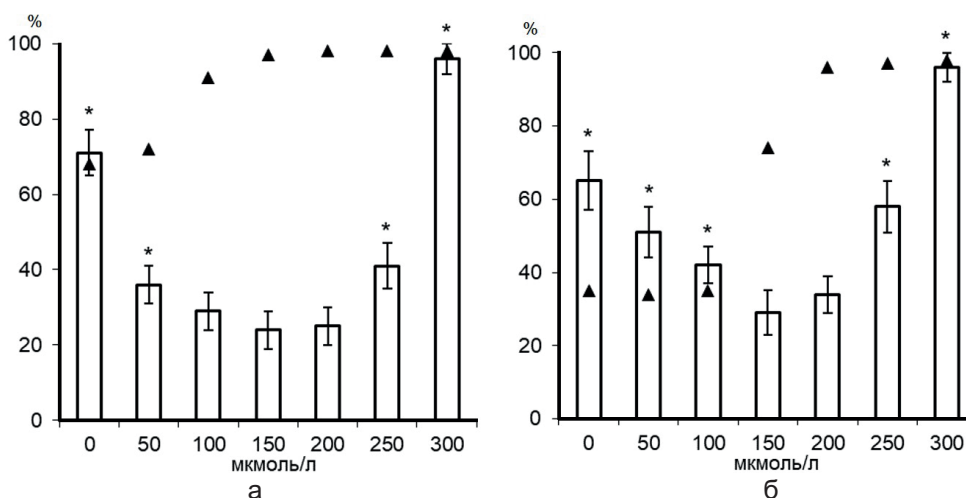


Рис. 2. Вплив трифторперазину на постгіпертонічний гемоліз еритроцитів людини (а) і кролика (б) при 37°C (трикутники) та 0°C (стовпчики). *P < 0,05 порівняно з мінімальним значенням гемолізу

амфіфільних сполук як з білковою, так і з ліпідною частиною мембрани. «Білкова» теорія припускає, що вони специфічно зв'язуються з певними білками-мішенями [9]. Нині численні рецептори та іонні канали були ідентифіковані як відповідні мішені. Зокрема, показано залучення скелетних білків еритроцитів, а саме актину, спектрину та білка 4.1, до модуляції плинності мембрани фенотіазинами [10]; зв'язування n-пропіл β-D-глюкопіранозиду з переносником глюкози GLUT1 [11]; взаємодію трифтоперазину та хлорпромазину з Ca²⁺-зв'язуючими білками, а саме кальмодуліном, і пригнічення відповідних транспортних систем [12]. Згідно з «ліпідною» теорією передбачається, що ліпіди мембран є гідрофобними ділянками неспецифічної взаємодії з амфіфільними сполуками. Інтеркаляція цих сполук у мембрани спричиняє зміну форми та об'єму клітин [3, 5, 13], транслокацію фосфатиди-

лсерину з внутрішнього у зовнішній шар мембрани [14], змінює організацію та розмір ліпідних рафтів [15].

Залежно від концентрації амфіфільні сполуки здатні стабілізувати чи солюбілізувати клітинні мембрани. Така двофазна поведінка спостерігалася як для іонних, так і для неіонних поверхнево-активних речовин. Відомо, що залежно від використовуваних концентрацій трифторперазин проявляє і захисний, і прогемолітичний ефект в ізосмотичних [16] або гіпоосмотичних умовах [4]. Одним із можливих пояснень захисної дії речовин амфіфільної природи на клітини при концентраціях нижчих за необхідну для міцелотворення є їх неспецифічний вплив на іонні канали [2] та утворення тимчасових дефектів проникності [4]. Передбачається, що при інтеркаляції в ліпідний бішар мембрани вони швидко викликають перебудову в середині бішару, які призводять до зміни

Вихід іонів калію (%) з еритроцитів ссавців при 0°C за наявності амфіфільних сполук

Схема досліджу	Людина		Кролик	
	NaCl		NaCl	
	0,15 моль/л	1,65 моль/л	0,15 моль/л	1,65 моль/л
Контроль	3 ± 3	56 ± 2	3 ± 1	82 ± 4
Децилсульфат натрію	4 ± 3	59 ± 5	3 ± 1	84 ± 8
Трифторперазин	2 ± 1	58 ± 5	3 ± 1	78 ± 6

проникності мембрани. Швидкий відтік іонів зменшує різницю в осмотичному тиску між внутрішньою та зовнішньою частиною клітини, тим самим захищаючи її. Але наші дослідження показали відсутність впливу трифтоперазину та децилсульфату натрію на вихід калію з еритроцитів ссавців. Отже, зміна проникності мембрани еритроцитів для іонів калію в умовах постгіпертонічного шоку не є причиною захисного ефекту цих сполук.

Інший варіант пояснення захисної дії амфіфільних речовин – збільшення критичного гемолітичного об'єму внаслідок вбудовування їх молекул у ліпідний бішар без зміни проникності мембрани. Цей варіант цілком узгоджується з отриманими результатами і може служити основою зниження пошкодження еритроцитів ссавців в умовах постгіпертонічного шоку.

Malheiros і співавт. [17] визначили досить невеликі молярні відносини трифторперазин/ліпід усередині мембрани, потрібні для солюбілізації. Це свідчить про те, що гемоліз викликається не рівномірним насиченням мембрани, а локальним утворенням змішаних міцел, що містять як амфіфільну сполуку, так і фосфоліпіди еритроцитів. Можна припустити, що на відміну 0°C при 37°C завдяки більшій плинності мембрани, міцели утворюються швидше і за більш низьких концентрацій амфіфільної речовини. Це пояснює відсутність захисного ефекту досліджуваних сполук при 37°C.

Мембрани еритроцитів кролика та людини відрізняються за фосфоліпідним складом, а саме мають різний кількісний розподіл за класами фосфоліпідів. Так, еритроцити кролика вирізняються меншою часткою сфінгомеліну та більшою фосфатидилхоліну у зовнішньому моношарі, більшою часткою фосфатидилетаноламіну та меншою фосфатидилсерину – у внутрішньому [18]. Це може впливати на процес вбудовування молекул амфіфільних сполук у мембрану, їх розподіл між клітиною та зовнішнім середовищем.

Наявність сфінгомеліну у модельних мембранах значно збільшує коефіцієнт розподілу ліпід/вода для етанолу [19], деяких сапонінів [20], та антипсихотичних препаратів, які мають амфіфільну природу [14]. Можна припустити, що досліджувані амфіфільні сполуки проявляють більшу спорідненість до сфінгомеліну, ніж до фосфатидилхоліну у мембранах еритроцитів. Це призведе до більш легкого вбудовування в еритроцити людини і більш вираженого захисного ефекту при мінімальній концентрації амфіфільної сполуки.

Крім того, у праці Saeedimazine і співавт. [21] повідомляється про менше проникнення води в бішар сфінгомелін/холестерин порівняно з бішаром фосфатидилхолін/холестерин при осмотичному навантаженні. А саме, в умовах експерименту з модельними мембранами при розтягуванні бішару, що містить сфінгомелін, спостерігалася більша кількість молекул води, що проникала поміж молекулами ліпідів порівняно з мембранами, що містили фосфатидилхолін. Це знижувало ліпофільність «сфінгомелінових» мембран порівняно з «фосфатидилхоліновими». Виходячи з цього, можна припустити, що в умовах постгіпертонічного шоку ліпофільні сполуки легше вбудовуються в мембрани, які більш багаті на сфінгомелін, тобто в еритроцити людини, що приводить до кращого захисного ефекту.

ВИСНОВКИ

Обидві амфіфільні сполуки як аніонний трифторперазин, так і катіонний децилсульфат натрію захищають еритроцити ссавців в умовах постгіпертонічного шоку. Показано, що захист здійснюється при досить невеликих концентраціях, використання яких не призводить до формування дефектів проникності для іонів калію. Пошкодження клітин, швидше за все, знижується внаслідок збільшення площі поверхні клітин при вбудовуванні молекул амфіфільної речовини у

мембрану. А саме при переміщенні клітини з гіпертонічних в ізотонічні умови додатковий об'єм дає змогу клітині «прийняти» більшу кількість води без пошкодження мембрани і розвитку гемолітичного процесу. Захист відбувається лише при 0°C, коли молекули, що вбудовуються, не мають можливості швидко переміщуватися у мембрані та формувати міцели. Особливості складу мембрани еритроцитів людини дають можливість амфільним сполукам легше вбудовуватися в мембрану, що забезпечує захист при менших концентраціях. Таким чином, отримані результати можуть слугувати підґрунтям для розуміння постгіпертонічного пошкодження еритроцитів та використовуватись для розробки протоколів захисту клітин під час розморожування.

Робота виконана в межах наукової тематики НДР: «Вивчення механізмів кріопошкодження еритроцитів ссавців на моделі постгіпертонічного шоку і після розморожування» (державний реєстраційний номер: 0119U100441) відділу кріоцитології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

N.A. Yershova, O.O. Chabanenko, N.M. Shpakova, O. E. Nipot, N.V. Orlova

EFFECT OF TRIFLUOROPERAZINE AND SODIUM DECYL SULFATE ON POSTHYPERTENSIVE SHOCK OF HUMAN AND RABBIT ERYTHROCYTES

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv;
e-mail: nipotel71@gmail.com*

The effects of trifluoroperazine and sodium decyl sulfate on posthypertonic shock of human and rabbit erythrocytes

were studied. For this purpose, the level of hemolysis in posthypertonic shock and the percentage of potassium ions released from erythrocytes in dehydration and rehydration solutions in the presence of trifluoroperazine and sodium decyl sulfate were determined. It is shown that the protective effect of amphiphilic compounds is manifested at 0°C, but not at 37°C. There is a decrease in the level of hemolysis in a certain concentration range of each of the studied substances. It was found that human erythrocytes are more sensitive to the protective action of the studied amphiphilic compounds and are characterized by a wider range of protective concentrations. This could be explained by the different lipid composition of the erythrocyte membranes of the studied mammals. Measurement of the leak of potassium ions in dehydration and rehydration media in the presence of amphiphilic compounds suggested that the latter do not affect the permeability of the membrane of mammalian erythrocytes for potassium in posthypertonic shock. Based on the obtained results and literature data, it is assumed that the protective effects of trifluoroperazine and sodium decyl sulfate occur independently of the formation of temporary defects in permeability for potassium ions, but involve an increase in the cell surface area due to the incorporation of amphiphilic molecules. This results to an increase in the critical hemolytic volume of erythrocytes and reduction in the level of damage during change from hypertonic conditions to isotonic ones.

Key words: human and rabbit erythrocytes; posthypertonic shock; hemolysis; amphiphilic compounds; potassium ions; membrane permeability.

REFERENCES

1. Muldrew K. The salting-in hypothesis of post-hypertonic lysis. *Cryobiology*. 2008;57(3):251-56.
2. Lundbæk JA. Lipid bilayer-mediated regulation of ion channel function by amphiphilic drugs. *J Gen Physiol*. 2008;131(5):421-29.
3. Steinkopf S, Schelderup AK, Gjerde HL, Pfeiffer J, Thoresen S, Gjerde AU, Holmsen H. The psychotropic drug olanzapine (Zyprexa®) increases the area of acid glycerophospholipid monolayers. *Biophys Chem*. 2008;134(1-2):39-46.
4. Hägerstrand H, Isomaa B. Amphiphile-induced antihemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation. *Chem Biol Interact*. 1991;79(3):335-47.
5. Ficarra S, Russo A, Barreca D, Giunta E, Galtieri A, Tellone E. Short-term effects of chlorpromazine on oxidative stress in erythrocyte functionality: activation of metabolism and membrane perturbation. *Oxidat Med Cell Longevit*. 2016;2016:2394130.
6. Yershova NA, Nipot EE, Shpakova NM, Yershov SS, Orlova NV. Effect of trifluoroperazine and dodecyl- β ,D-maltoside on hypertonic stress of mammalian erythrocytes. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2014;24(3):231-37. [Russian].
7. Iershov SS, Pysarenko NA, Orlova NV, Shpakova NM. Effect of cationic and anionic amphiphilic compounds on

- hypertonic cryohemolysis of mammalian red blood cells. *Fiziol Zh.* 2007;53(6):78-84. [Ukrainian].
8. Orlova NV, Shpakova NM. Mechanism of protective effect of amphiphilic compounds during hypertonic hemolysis of erythrocytes. *Fiziol Zh.* 2006;52(5):55-61. [Ukrainian].
 9. Uesono Y, Toh-e A, Kikuchi Y, Araki T, Hachiya T, Watanabe CK, Noguchi K, Terashima I. Local anesthetics and antipsychotic phenothiazines interact nonspecifically with membranes and inhibit hexose transporters in yeast. *Genetics.* 2016;202(3):997-1012.
 10. Minetti M, Di Stasi AM. Involvement of erythrocyte skeletal proteins in the modulation of membrane fluidity by phenothiazines. *Biochemistry.* 1987;26(25):8133-7.
 11. Gorga FR, Lienhard GE. Equilibria and kinetics of ligand binding to the human erythrocyte glucose transporter. Evidence for an alternating conformation model for transport. *Biochemistry.* 1981;20(18):5108-13.
 12. Raess BU, Vincenzi FF. Calmodulin activation of red blood Cell ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$)-ATPase and its antagonism by phenothiazines. *Mol Pharmacol.* 1980;18(2):253-8.
 13. Shpakova NM, Semionova EA, Kovalenko IF, Iershova NA, Orlova NV. Morphological peculiarities of temperature and osmotic response of erythrocytes in presence of chlorpromazine. *Fiziol Zh.* 2017;63(5):62-9. [Ukrainian].
 14. Alvesa I, Stanevab G, Tessierac C, Salgadod GF, Nussac P. The interaction of antipsychotic drugs with lipids and subsequent lipid reorganization investigated using biophysical methods. *Biochim Biophys Acta – Biomembr.* 2011;1808(8):2009-18.
 15. Wesołowska O, Michalak K, Hendrich AB. Direct visualization of phase separation induced by phenothiazine-type antipsychotic drugs in model lipid membranes. *Mol Membrane Biol.* 2011;28(2):103-14.
 16. Habibi S, Lee HY, Moncada-Hernandez H, Gooding J, Minericka AR. Impacts of low concentration surfactant on red blood cell dielectrophoretic responses. *Biomicrofluidics.* 2019;13(5):054101.
 17. Malheiros SVP, Meirelles NC, de Paula E. Pathways involved in trifluoperazine-, dibucaine- and praziquantel-induced hemolysis. *Biophys Chem.* 2000;83:89-100.
 18. 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 USA.* 1998;95(9):4964-9.
 19. Trandum C, Westh P, Jørgensen K, Mouritsen OG. Association of ethanol with lipid membranes containing cholesterol, sphingomyelin and ganglioside: a titration calorimetry study. *Biochim Biophys Acta – Biomembr.* 1999;1420(1-2):179-88.
 20. Verstraeten SL, Deleu M, Janikowska-Sagan M, Claereboudt EJS, Lins L, Tyteca D, Mingeot-Leclercq M-P. The activity of the saponin ginsenoside Rh2 is enhanced by the interaction with membrane sphingomyelin but depressed by cholesterol. *Sci Rep.* 2019;9:7285.
 21. Saeedimasing M, Montanino A, Kleiven S, Villa A. Role of lipid composition on the structural and mechanical features of axonal membranes: a molecular simulation study. *Sci Rep.* 2019;9:8000.

*Матеріал надійшов
до редакції 01.11.2021*