

Роль енергетичного статусу клітини у протектуванні постгіпертонічного гемолізу амфифільними речовинами

О.Є. Ніпот, Н.А. Єршова, О.О. Шапкіна, Н.М. Шпакова, С.С. Єршов, Н.В. Орлова

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

Вивчали вплив виснаження внутрішньоклітинного вмісту АТФ на захист еритроцитів кролика амфифільними речовинами в умовах постгіпертонічного шоку. Для цього визначали рівень гемолізу нативних та метаболічно виснажених еритроцитів за наявності та у відсутності амфифільних речовин. Показано, що виснаження внутрішньоклітинного вмісту АТФ знижує на 15–17% постгіпертонічне пошкодження клітин як при 0°C, так і при 37°C. Виявлено, що амфифільні сполуки здатні захищати еритроцити кролика в умовах постгіпертонічного шоку, але лише при 0°C. Для метаболічно виснажених клітин тільки аніонний децилсульфат натрію та неіонний децил-β,D-глюкопіранозид зберігали свою захисну дію, натомість катіонні хлорпромазин та трифторперазин втрачали таку можливість. Це можна пояснити, виходячи з особливостей вбудовування амфифілів у еритроцитарну мембрану. Усі досліджувані амфифільні сполуки підвищують рівень пошкодження як контрольних, так і метаболічно виснажених клітин в умовах постгіпертонічного шоку при 37°C. Імовірно, полегшене вбудовування та підвищена плинність мембрани за такої температури дестабілізують бішар та нівелюють захисну дію амфифільних сполук.

Ключові слова: еритроцити кролика; постгіпертонічний шок; гемоліз; амфифільні сполуки; АТФ; метаболічне виснаження.

ВСТУП

У процесі розморожування кріоконсервованих еритроцитів їх мембрана піддається надмірному осмотичному навантаженню при поверненні клітин в фізіологічні умови [1]. Для вивчення цього процесу створена модель постгіпертонічного шоку. На першому етапі еритроцити піддаються дії гіпертонічного розчину, що імітує виморожування води і концентрування кріозахисного середовища, на другому – вони переміщуються в ізотонічний розчин [2]. У рамках цієї моделі, змінюючи вихідний стан клітин, температурні і осмотичні умови, вводячи додаткові речовини, можна підбирати оптимальні умови для розморожування клітин, вивчати механізми пошкодження та захисту еритроцитів.

Однією з важливих характеристик клітини, що визначає її стан, є вміст АТФ, який

служить основним джерелом енергії в еритроцитах ссавців. Він визначає ступінь фосфорилування мембранних білків і ліпідів, що модулює взаємодію бішару з цитоскелетом і впливає на стабільність мембрани [3]. Зниження концентрації АТФ в еритроцитах супроводжується зміною стану ліпідного бішару, цитозольної білкової мережі, функціонування низки ферментних і транспортних систем [4, 5]. Це може позначатися на здатності еритроцитів протистояти стресовим навантаженням. Так, згідно з даними попередніх досліджень, чутливість еритроцитів як людини, так і тварин, змінюється після виснаження внутрішньоклітинного вмісту АТФ щодо гіпотонічного, гіпертонічного та механічного шоку [6, 7].

Ми використовували амфифільні сполуки, які мають протекторні властивості відносно еритроцитів людини в умовах експериментів,

© О.Є. Ніпот, Н.А. Єршова, О.О. Шапкіна, Н.М. Шпакова, С.С. Єршов, Н.В. Орлова

що моделюють різні етапи кріоконсервування, а саме кріогемолізу, гіпертонічного та постгіпертонічного шоку [8, 9]. Було цікаво дізнатись, чи залежать захисні властивості амфифільних речовин від енергетичного статусу клітини, який може змінюватися за умов тривалого зберігання еритроцитів.

Дослідження було проведено на еритроцитах кролика. Слід відмітити, що результати, отримані за допомогою «тваринних» моделей, не завжди точно можна екстраполювати на людину. Однак вони можуть дати важливу інформацію про досліджувані явища. Наприклад, у фундаментальній біології модель на тваринах може використовуватися для розуміння механізмів процесів, які вивчаються, щоб допомогти визначити напрями подальших досліджень.

Мета нашої роботи – визначити, чи зберігаються протекторні властивості трифторперазину, хлорпромазину, децилсульфату натрію, децил- β ,D-глюкопіранозиду в умовах постгіпертонічного шоку еритроцитів кролика після виснаження внутрішньоклітинного вмісту АТФ.

МЕТОДИКА

Для дослідження використовували еритроцити, отримані з крові кролика. Роботу з тваринами проводили відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах» (V Національний конгрес з біоетики, Київ, 2013). Після видалення плазми еритромасу двічі відмивали центрифугуванням 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). Виснаження внутрішньоклітинного вмісту АТФ проводили таким чином. Еритроцити інкубували з 2-дезоксиглюкозою (10 ммоль/л) протягом 2 год при 37°C, після чого відмивали фізіологічним розчином. Постгіпертонічний шок здійснювали ізотермічним перенесенням еритроцитів з 2,0 моль/л NaCl у 0,15 моль/л NaCl при 0 та при 37°C.

Амфифільні речовини трифторперазин (150 мкмоль/л), хлорпромазин (400 мкмоль/л), децилсульфат натрію (600 мкмоль/л), децил- β ,D-глюкопіранозид (800 мкмоль/л) додавали в 0,15 моль/л NaCl перед внесенням клітин. Вміст гемоглобіну в супернатанті визначали спектрофотометрично.

Для всіх зразків обчислювали середнє арифметичне значення і середньоквадратичну помилку ($M \pm m$). Статистичну обробку отриманих експериментальних результатів проводили за допомогою програми «Statistica 6.0» («StatSoft Inc.», США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

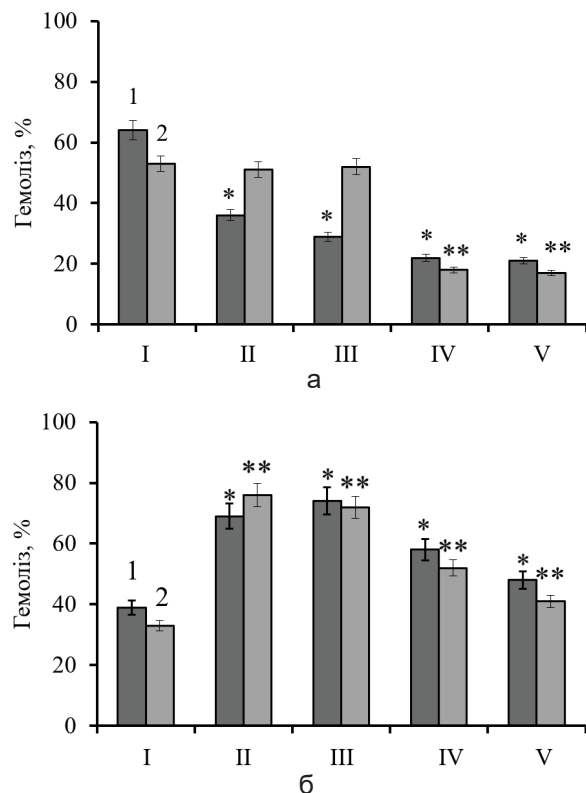
Виснаження внутрішньоклітинного вмісту АТФ змінює як реакцію клітин на стресовий вплив, так і на здатність протектуючих речовин захищати клітини від нього. На рисунку (а) представлено результати щодо рівня гемолізу еритроцитів кролика в умовах постгіпертонічного шоку при 0°C. Видно, що пошкодження клітин зменшується на $17 \pm 3\%$ після їх метаболічного виснаження (І).

Усі досліджувані амфифільні сполуки знижують пошкодження нативних клітин в умовах постгіпертонічного шоку: хлорпромазин – на $44 \pm 3\%$, трифторперазин – на $55 \pm 4\%$, децилсульфат натрію – на $66 \pm 6\%$, децил- β ,D-глюкопіранозид – на $66 \pm 5\%$. Виснаження внутрішньоклітинного вмісту АТФ змінює чутливість еритроцитів кролика відносно захисної дії амфифільних сполук. Такі катіонні сполуки, як трифторперазин та хлорпромазин, не впливають на постгіпертонічний гемоліз цих клітин, водночас аніонний децилсульфат натрію та неіонний децил- β ,D-глюкопіранозид знижують рівень постгіпертонічного гемолізу метаболічно виснажених еритроцитів кролика: хлорпромазин – на $3 \pm 1\%$, трифторперазин – на $2 \pm 1\%$, децилсульфат натрію – на $66 \pm 5\%$, децил- β ,D-глюкопіранозид – на $66 \pm 7\%$.

При 37°C теж спостерігається зменшення на $15 \pm 4\%$ пошкодження клітин після

виснаження внутрішньоклітинного вмісту АТФ (див. рисунок, б). за цієї температури всі досліджувані амфіфільні сполуки підвищували рівень пошкодження як контрольних, так і метаболічно виснажених клітин. Отже, значне зниження внутрішньоклітинного вмісту АТФ не впливає на чутливість еритроцитів кролика щодо дії амфіфільних сполук при 37°C.

Отримані результати показали, що амфіфільні сполуки здатні захищати еритроцити кролика в умовах постгіпертонічного шоку, але лише за 0°C. При дефіциті енергії тільки аніонні (децилсульфат натрію) та неіонні (децил- β ,D-глюкопіранозид) сполуки зберігають свою захисну дію, натомість



Рівень постгіпертонічного гемолізу нативних (1) та метаболічно виснажених (2) еритроцитів за відсутності (I) та наявності (II, III, IV, V) амфіфільних сполук при 0°C (а) та 37°C (б): I – контроль; II – хлорпромазин; III – трифторперазин; IV – децилсульфат натрію; V – децил- β ,D-глюкопіранозид. * $P < 0,05$ щодо контрольних нативних клітин, ** $P < 0,05$ щодо контрольних метаболічно виснажених клітин

катіонні (хлорпромазин та трифторперазин) втрачають таку можливість.

Відомо, що метаболічне виснаження еритроцитів призводить до сильнішої асоціації між спектрином і мембраною, оскільки зниження концентрації АТФ запобігає фосфорилуванню білка 4.1R, що сприяє зв'язуванню комплексу 4.1R-спектрин-актин. Внаслідок цього збільшується модуль пружності, натягу та в'язкості мембрани [3–5]. Це може бути причиною деякого зниження пошкодження метаболічно виснажених еритроцитів за умов постгіпертонічного шоку, оскільки механічна тривкість мембрани підвищується.

Амфіфільні речовини відомі своєю подвійною дією на клітини. Вище від критичної концентрації міцелоутворення поверхнево-активні речовини солюбілізують клітинні мембрани та викликають гемоліз еритроцитів, а при нижчих концентраціях захищають еритроцити від таких стресових впливів, як гіпотонічний шок. Було запропоновано два різних механізми для пояснення цієї осмотичної резистентності. У першому варіанті молекули поверхнево-активної речовини вбудовуються в клітинну мембрану, викликаючи її збільшення та зменшення натягу. Таким чином, еритроцити мають можливість збільшувати свій об'єм до більших значень перш ніж досягнути критичного гемолітичного об'єму. [10, 11]. Другий механізм полягає в збільшенні швидкості дифузії катіонів через клітинну мембрану, внаслідок формування дефектів проникності, що знімає осмотичний стрес і запобігає гемолізу [12]. Відсутність витоку іонів калію під час інкубації еритроцитів з низькими концентраціями амфіфільних речовин свідчить на користь першого припущення [13].

Порівняння результатів, представлених на рисунку, показує, що дія амфіфільних сполук в умовах постгіпертонічного гемолізу залежить від температури. Захисна дія проявляється тільки при 0°C, а при 37°C підсилюється гемолітичне пошкодження

клітин. Щоб пояснити це, розглянемо процес вбудовування амфіфілу в мембрану. Він має два етапи – інтеркаляція сполуки в мембрану та розподіл у межах бішару. Перший значною мірою визначається гідрофобними взаємодіями, другий – електростатичними. При підвищенні температури гідрофобні взаємодії підсилюються, що полегшує вбудовування амфіфільних речовин у мембрану [14]. З іншого боку, при 37°C плинність мембрани вища, ніж при 0°C [15], молекули амфіфільних сполук легше переміщуються та формують міцели разом з фосфоліпідами, що порушує бішар, та надає йому нестабільності. Це може підвищувати чутливість еритроцитів до стресового впливу та нівелювати захисну дію амфіфілів.

Виснаження внутрішньоклітинного вмісту АТФ змінює захисний ефект амфіфільних сполук. Хлорпромазин та трифторперазин втрачають можливість захищати еритроцити кролика в умовах постгіпертонічного шоку, водночас С10 та децил- β ,D-глюкопіранозид зберігають її. Це можна пояснити, виходячи з особливостей вбудовування їх у еритроцитарну мембрану. Хлорпромазин та трифторперазин є катіонними амфіфільними сполуками. Після інтеркаляції у поверхневий шар вони проникають у внутрішній моношар та зв'язуються з аніонними ліпідними компонентами, що розташовані у внутрішньому моношарі ліпідного бішару мембрани [16]. Основний негативно заряджений ліпід у внутрішньому моношарі – фосфатидилсерин – має приблизно 60% негативного заряду ліпідів. Інші аніонні фосфоліпіди, такі як фосфатидилінозитол, фосфатидна кислота і поліфосфоінозитиди, є мінорними, але в сукупності вносять 40% негативного заряду [17]. Відомо, що при метаболічному виснаженні вміст поліфосфоінозитидів та фосфатидної кислоти знижується [18]. Таким чином, невелика зміна молярних концентрацій цих ліпідів може призвести до достатніх змін аніонного заряду внутрішнього ліпідного моношару мембрани. Це може знижувати зв'язування

хлорпромазину та трифторперазину з мембраною та слугувати поясненням відсутності захисної дії цієї амфіфільної речовини щодо метаболічно виснажених клітин. Натомість, децилсульфат натрію та децил- β ,D-глюкопіранозид перерозподіляються переважно у зовнішньому моношарі мембрани, який не зазнає змін при зниженні концентрації АТФ [19], і тому зберігають свої протектуючі властивості в умовах постгіпертонічного шоку.

Таким чином, захисна дія певних речовин в умовах стресового впливу на клітини значно залежить від їх стану. Так, при тривалому зберіганні еритроцитів може змінитися їх енергетичний статус, клітини можуть бути частково або повністю виснажені за внутрішньоклітинним вмістом АТФ. Цей факт потрібно враховувати при підготовці клітин до кріоконсервації, застосуванні певних режимів зберігання та підборі кріозахисних речовин. Модельні експерименти можуть бути корисними, бо здатні врахувати усі умови окремо та передбачити результати реального процесу.

Робота виконана в межах наукової тематики НДР :«Вивчення механізмів кріопозамороження 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.

**O.E. Nipot, N.A. Yershova, O.O. Shapkina,
N.M. Shpakova, S.S. Yershov, N.V. Orlova**

THE ROLE OF CELL ENERGY STATUS IN THE PROTECTION OF POSTHYPERTONIC HEMOLYSIS BY AMPHIPHILIC SUBSTANCES

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

The effect of ATP depletion on the protection of rabbit erythrocytes by amphiphilic substances in posthypertonic shock conditions was studied. For this, the level of hemolysis in posthypertonic shock of native and ATP-depleted erythrocytes in the presence of amphiphilic substances was determined. It was shown that ATP depletion reduces posthypertonic cell damage by 15-17% both at 0°C and at 37°C. It was found that amphiphilic compounds are able to protect rabbit erythrocytes in conditions of posthypertonic shock, but only at a temperature of 0°C. In conditions of ATP-depletion of cells, only anionic sodium decyl sulfate and nonionic decyl-β,D-glucopyranoside retain their protective effect in posthypertonic shock conditions, whereas cationic chlorpromazine and trifluoroperazine lose this ability. This can be explained based on the features of the incorporation of amphiphiles into the erythrocyte membrane. All studied amphiphilic compounds increase the level of damage in both control and ATP-depleted cells under conditions of posthypertonic shock at a temperature of 37°C. Probably, easier intercalation and increased fluidity of the membrane at this temperature destabilize the bilayer and reduce the protective effect of amphiphilic compounds.
Key words: rabbit erythrocytes; posthypertonic shock; hemolysis; amphiphilic compounds; ATP; metabolic depletion.

REFERENCES

1. Bojic S, Murray A, Bentley BL, Spindler R, Pawlik P, Cordeiro JL, et al. Winter is coming: the future of cryopreservation. *BMC Biol.* 2021;19(1):56.
2. Muldrew K. The salting-in hypothesis of post-hypertonic lysis. *Cryobiology.* 2008;57(3):251-56.
3. Betz T, Lenz M, Joanny J-F, Sykes C. ATP-dependent mechanics of red blood cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(36):15320-25.
4. Ivanov IT, Paarvanova BK Differential dielectroscopic data on the relation of erythrocyte membrane skeleton to erythrocyte deformability and flicker. *Eur Biophys J.* 2021;50(1):69-86.
5. Reinhart SA, Schulzki T, Bonetti PO, Reinhart WH. Studies on metabolically depleted erythrocytes. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2014;56(2):161-73.
6. Sakota D, Sakamoto R, Yokoyama N, Kobayashi M, Takatani S. Glucose depletion enhances sensitivity to

shear stress-induced mechanical damage in red blood cells by rotary blood pumps. *Artif Organs.* 2009;33(9):733-9.

7. Shpakova NM, Nipot EYe, Orlova NV, Aleksandrova DI, Shapkina OA. Osmotic sensitivity of mammalian erythrocytes after their ATP depletion. *Reports NAS Ukr.* 2013;1:151-5. [Russian].
8. 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].
9. Orlova NV, Shpakova NM. Mechanism of protective effect of amphiphilic compounds during hypertonic hemolysis of erythrocytes. *Fiziol Zh.* 2006;52(5):55-61. [Ukrainian].
10. 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.
11. 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.
12. Hägerstrand H, Isomaa B. Amphiphile-induced antihaemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation. *Chem Biol Interact.* 1991;79(3):335-47.
13. Yershova NA, Chabanenko OO, Shpakova NM, Nipot OE, Orlova NV. Effect of trifluoroperazine and sodium decyl sulfate on the posthypertensive shock of human and rabbit red blood cells. *Fiziol Zh.* 2022;68(1):62-8. [Ukrainian].
14. Durell SR, Ben-Naim A. Temperature dependence of hydrophobic and hydrophilic forces and interactions. *J Phys Chem.* 2021;125 (48): 13137-46.
15. Färber N, Westerhausen C. Broad lipid phase transitions in mammalian cell membranes measured by Laurdan fluorescence spectroscopy. *Biochim Biophys Acta – Biomembran.* 2022;1864(1):183794.
16. Zachowski A, Durand P. Biphasic nature of the binding of cationic amphipaths with artificial and biological membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1988;937(2):411-6.
17. Chen JY, Brunauer LS, Chu FC, Helsel CM, Gedde MM, Huestis WH. Selective amphipathic nature of chlorpromazine binding to plasma membrane bilayers. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1616(1):95-105.
18. Butikofer P, Lin ZW, Kuypers FA, Scott MD, Xu CM, Wagner GM, et al. Chlorpromazine inhibits vesiculation, alters phosphoinositide turnover and changes deformability of ATP-depleted RBCs. *Blood.* 1989;73(6):1699-704.
19. Riske KA, Domingues CC, Casadei BR, Mattei B, Caritá AC, Lira RB, et al. Biophysical approaches in the study of biomembrane solubilization: quantitative assessment and the role of lateral inhomogeneity. *Biophys Rev.* 2017;5:649-67.

*Матеріал надійшов
до редакції 18.07.2022*