

УДК 577.1 : 57.043 : 611—018.51

© 1991 г.

Н. М. ШПАКОВА, В. А. БОНДАРЕНКО

ДЕЙСТВИЕ ХЛОПРОМАЗИНА НА ТЕМПЕРАТУРНУЮ И ОСМОТИЧЕСКУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ

Ключевые слова: эритроцит, холодовой шок, хлорпромазин.

Установлено, что направленность влияния хлорпромазина на развитие холодового шока эритроцитов в растворах хлористого натрия зависит от тоничности среды, в которой производится охлаждение клеток от 37 до 0°, а также от концентрации амфипата. При охлаждении эритроцитов в средах, содержащих NaCl в концентрации 0,75–1,50 М, хлорпромазин ($7 \cdot 10^{-5}$, $2,1 \cdot 10^{-4}$ и $3,5 \cdot 10^{-4}$ М) ингибирует лизис. При охлаждении клеток в области умеренной гипертонации (0,30–0,60 М NaCl) модифицирующее действие хлорпромазина на чувствительность эритроцитов к холодовому шоку не проявляется, в условиях изо- и гипотонии хлорпромазин в концентрации $2,1 \cdot 10^{-4}$ и $3,5 \cdot 10^{-4}$ М оказывает стимулирующее влияние на лизис эритроцитов при охлаждении. При значительном повышении тоничности среды (до 1,80 М и выше) развивается изотермический гемолиз клеток, который более выражен при 0°, нежели при 37°, причем хлорпромазин при низкой температуре существенно активизирует гемолитический процесс.

Изменение температурных и осмотических условий среды является фактором, способным вызвать глубокие изменения структуры и функции клетки [1–3]. Разрушение клеток наблюдается не только при замораживании, но и при охлаждении в области положительной температуры, когда кристаллизация водной фазы отсутствует. Подобное явление, названное холодовым шоком, наблюдается при охлаждении многих клеток [3, 4]. Эритроциты приобретают чувствительность к охлаждению в интервале 37–0° после предварительного выдерживания в гипертонических растворах электролитов и неэлектролитов [5]. Так как основной мишенью повреждающего действия гиперосмолярности является плазматическая мембрана [1, 2], можно предположить, что температурная и осмотическая чувствительность клеток будет изменяться при модификации физико-химических свойств мембраны. Выраженное модифицирующее действие на плазматическую мембрану оказывают амфипатические соединения [6, 7]. В данной работе мы изучали модифицирующее действие хлорпромазина — катионного амфипата, способного распределяться во внутренний монослой мембраны, на чувствительность эритроцитов к изменению осмотических и температурных условий среды в интервале 37–0°.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эритроциты получали из донорской крови II группы. После удаления плазмы эритромассу дважды отмывали физиологическим раствором (0,15 М NaCl, 0,01 М фосфатный буфер, pH 7,4) и готовили суспензию эритроцитов, которую инкубировали в физиологической среде с соответствующими концентрациями хлорпромазина на водяной бане при температуре 37° в течение 30 мин.

2125

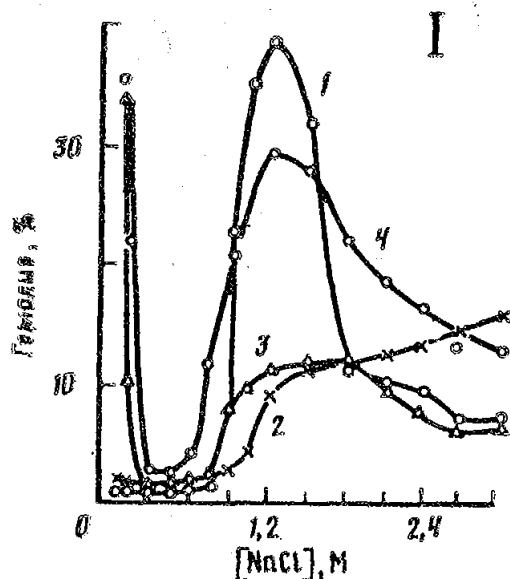


Рис. 1. Зависимость величины гемолиза эритроцитов от тоничности среды и концентрации хлорпромазина (ХПР) на этапе охлаждения клеток от 37 до 0°: 1 — контроль, 2 — $7 \cdot 10^{-5}$, 3 — $2,1 \cdot 10^{-4}$, 4 — $3,5 \cdot 10^{-4}$ М ХПР

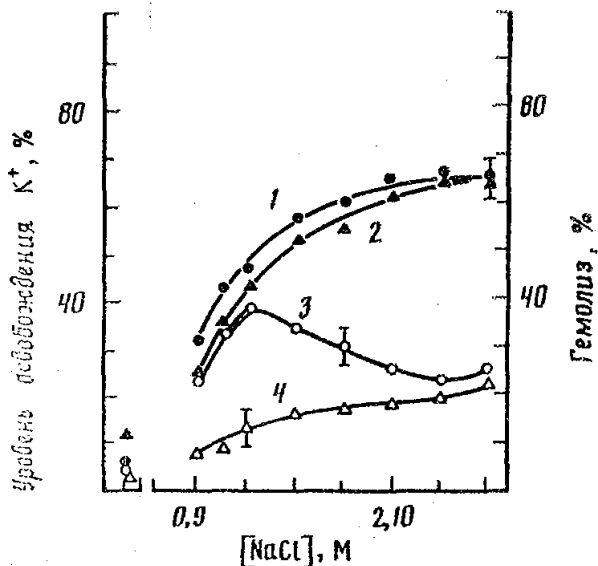


Рис. 2. Влияние хлорпромазина ($7 \cdot 10^{-5}$ М) на выход ионов K^+ на этапе инкубации клеток при 37° в присутствии различных концентраций NaCl (1, 2) и на гемолиз эритроцитов при охлаждении от 37 до 0° (3, 4): 1, 3 — контрольные клетки; 2, 4 — клетки, модифицированные хлорпромазином

Для изучения влияния осмотических факторов суспензию эритроцитов (1%-ный гематокрит) помещали на 15 мин в различные среды при температурах 0 и 37°. Холодовой шок осуществляли переносом проб, проинкубированных при 37° в течение 15 мин, в 0° на то же время (скорость охлаждения 1–2 град/с). В работе контроль температуры осуществляли с помощью медь-капельного термоэлектрического преобразователя. После завершения инкубации пробы центрифугировали и поглощение супернатанта определяли спектрофотометрически при 543 нм. Выход гемоглобина рассчитывали в процентах по отношению к 100%-ному гемолизу.

Перед определением ионов K^+ в исследуемые пробы для осаждения белков добавляли трихлоруксусную кислоту с расчетом, чтобы ее конечная концентрация была 0,3 М. После центрифугирования отбирали супернатант, в котором определяли содержание ионов K^+ на приборе ПАЖ-1. Содержание K^+ выражали в процентах по отношению к пробе со 100%-ным гемолизом.

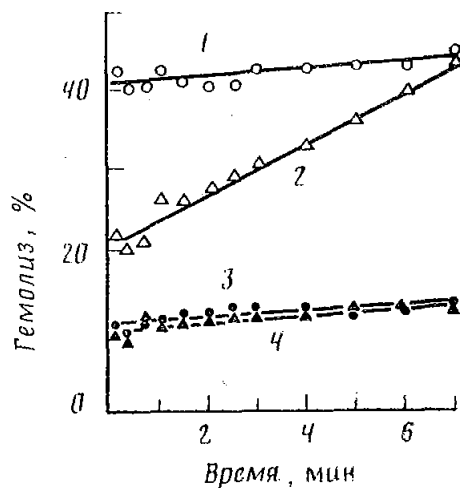
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В эксперименте изучалось влияние различных концентраций хлорпромазина на развитие холодового шока эритроцитов при охлаждении в солевых средах (0,10–3,00 М NaCl) (рис. 1). Результаты, представленные на рис. 1, отражают уровень гемолиза эритроцитов на этапе охлаждения, который определялся как разница между величиной гемолиза после выдерживания клеток при 0° и таковой на предварительном этапе инкубации при 37° в растворе хлористого натрия.

В целом в интервале используемых концентраций NaCl можно выделить четыре области, в пределах которых развитие холодового шока эритроцитов проявляется неодинаково.

Первая область — изотоническая (в районе 0,15 М NaCl и ниже), в которой наблюдается стимулирующее действие хлорпромазина на развитие холодового шока (рис. 1). Чем обусловлено подобное влияние хлорпромазина на развитие гемолиза эритроцитов в изо- и гипотонических средах — неясно. В процессе охлаждения локальная концентрация хлорпромазина

Рис. 3. Уровень гемолиза эритроцитов, подвергнутых охлаждению от 37 до 0° в присутствии 1,20 М NaCl, в зависимости от времени инкубации при 0° перед восстановлением исходных температурных условий (37°): 1 — охлаждение нормальных эритроцитов без восстановления исходных температурных условий; 2 — охлаждение нормальных эритроцитов с последующим переносом в 37° в различные периоды инкубации при 0° (0–7 мин); 3 — то же, что 1, но после обработки клеток хлорпромазином ($7 \cdot 10^{-5}$ М); 4 — то же, что 2, но после обработки клеток хлорпромазином



может возрастать в результате перераспределения молекул амфипата в более жидкие участки бислоя и достигать сублитических значений.

Для области концентраций NaCl 0,30–0,60 М (рис. 1) характерно практически полное отсутствие лизиса эритроцитов при охлаждении, причем независимо от концентрации хлорпромазина. Можно предположить, что процесс кренирования клеток, характерный для этой области концентраций NaCl [2], сопровождается модификацией структуры плазматической мембраны и белкового скелета, что повышает устойчивость клеток к действию мембранотропных соединений, гиперосмотической среды и охлаждения.

Критическая область концентраций NaCl, в пределах которой развивается холодовой шок, охватывает интервал 0,75–1,50 М. Эта область совпадает с интервалом осмолярности, в котором наблюдается нарушение барьерной функции мембраны и формируются каналы утечки для ионов K^+ [2]. Хлорпромазин оказывает выраженный протектирующий эффект при охлаждении эритроцитов в указанном концентрационном интервале NaCl (рис. 1). Это может быть связано с влиянием амфипата на процессы, связанные с формированием каналов для ионов K^+ перед охлаждением. Однако из данных, представленных на рис. 2, следует, что защитное действие хлорпромазина при холодовом шоке не связано с его влиянием на процессы, вызывающие освобождение ионов K^+ на этапе предварительной инкубации. Следовательно, протектирующее действие амфипата обусловлено его влиянием на этапы, контролирующие развитие лизиса клеток при сдвиге температуры от 37 до 0°.

Данные, представленные на рис. 3, косвенно свидетельствуют о способности хлорпромазина влиять на сами дефекты мембраны, вызывая их замыкание. В указанных экспериментах нормальные и обработанные хлорпромазином эритроциты охлаждались в присутствии 1,2 М NaCl от 37 до 0°. После того, как достигалась конечная температура охлаждения (0°), клетки выдерживались при этой температуре различное время (от 0 до 7 мин), после чего часть образцов переносили в исходные температурные условия (37°), а оставшиеся паходились при 0° и инкубировались 7 мин. Как видно из данных, представленных на рис. 3, степень повреждения эритроцитов после охлаждения до 0° в значительной мере зависит от продолжительности экспонирования клеток при низкой температуре. При увеличении продолжительности экспонирования до 7 мин восстановление исходных температурных условий уже не ингибирует развитие гемолиза (рис. 3, кривые 1 и 2). Иная картина наблюдается после обработки кле-

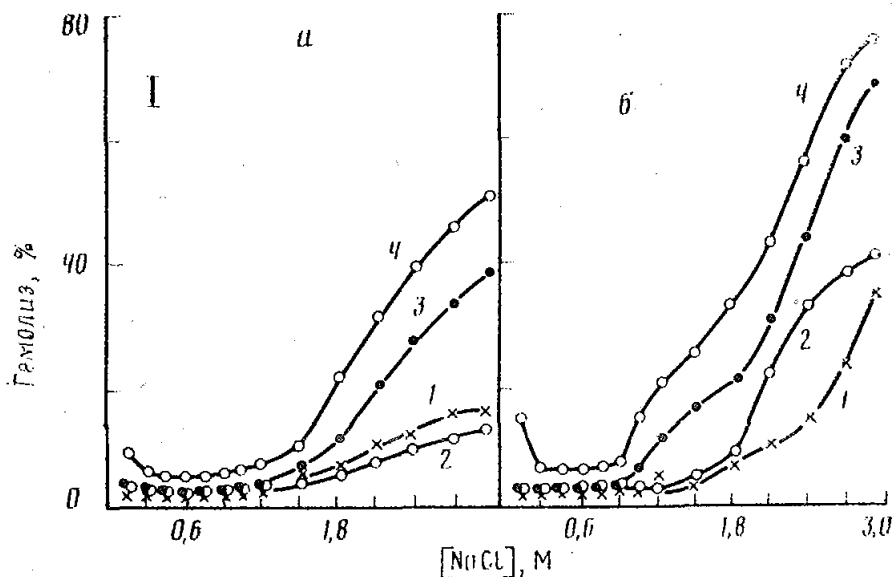


Рис. 4. Зависимость величины гемолиза эритроцитов от тоничности среды и концентрации хлорпромазина при температурах 37 (а) и 0° (б): 1 — контроль, 2 — $7 \cdot 10^{-4}$, 3 — $2,1 \cdot 10^{-4}$, 4 — $3,5 \cdot 10^{-4}$ М ХПР

ток хлорпромазином (рис. 3, кривые 3 и 4). В этом случае независимо от температуры и продолжительности экспонирования наблюдается резкое снижение уровня гемолиза эритроцитов, обработанных хлорпромазином, по сравнению с контрольными клетками, что свидетельствует о влиянии указанного амфиата на сами дефекты мембраны, которое приводит к замыканию последних. Полученные результаты согласуются с данными о том, что хлорпромазин может влиять на сами дефекты, вызывая их замыкание, причем это более значительно проявляется при низкой, а не при высокой температуре [8, 9].

В связи с многоплановым влиянием амфиатов, и в частности хлорпромазина, на различные системы и компоненты клеток [10—13] защитное действие амфиата в условиях холодового шока (в средах, содержащих 0,75—1,50 М NaCl) может обеспечиваться различными механизмами. В частности, протектирующее действие хлорпромазина в указанных условиях может быть связано с его влиянием на структурные переходы белков, например на переход при $+8^\circ$ [10], а также на системы, контролирующие ионный гомеостаз клетки, в частности на Ca-зависимые K⁺-каналы [11]. Кроме сказанного выше амфиаты, включающиеся в мембрану (такие, как хлорпромазин), способны оказывать значительное влияние на процесс фазового разделения липидов как в модельных, так и в природных мембранах [6, 12]. Действие хлорпромазина на процесс замыкания дефектов при низких температурах может быть обусловлено плавлением ригидных доменов, формирующихся в мембране в процессе разделения липидных фаз [13].

Четвертая область, в пределах которой наблюдается развитие холодового шока эритроцитов, охватывает интервал концентраций NaCl 1,80—3,00 М (рис. 1). В указанной области концентраций электролита наблюдается снижение уровня гемолиза клеток на этапе охлаждения, что объясняется значительным исходным повреждением мембраны в процессе инкубации клеток при 37° (рис. 4). Хлорпромазин оказывает существенное влияние на развитие изотермического лизиса эритроцитов в указан-

ной области концентраций NaCl, причем стимулирующее действие этого соединения на развитие гемолиза при 37° резко возрастает при повышении его концентрации (рис. 4, а). Снижение температуры инкубации (0°) приводит к резкому возрастанию уровня гемолиза эритроцитов, причем положение концентрационной границы NaCl, выше которой наблюдается развитие лизиса клеток, зависит от используемой концентрации хлорпромазина (рис. 4, б). Таким образом, полученные данные указывают на синергизм в действии хлорпромазина и высоких концентраций NaCl (выше 1,80 М). Снижение температуры инкубации на фоне совместного действия двух факторов — высокой тоничности среды и высоких локальных концентраций хлорпромазина — может проявиться в эффекте, аддитивном относительно модифицирующего влияния каждого из этих факторов на мембрану, в результате чего уровень изотермического гемолиза возрастает.

Таким образом, в широком интервале концентраций NaCl хлорпромазин способен значительно модифицировать состояние эритроцитов, причем проявление этого действия зависит от тоничности среды, в которой инкубируются и охлаждаются клетки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. Киев: Наукова думка, 1982. 255 с.
2. Бондаренко Т. П. Роль липидов в повреждении мембран митохондрий и эритроцитов при охлаждении: Дис. ... канд. биол. наук. Харьков: Ин-т проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, 1981. 151 с.
3. Takahashi T., Williams R. J. // Cryobiology. 1983. V. 20. № 5. P. 507–520.
4. McLellan M. R., Morris G. J., Coulson G. E. et al. // Cryobiology. 1984. V. 21. № 1. P. 44–60.
5. Jung C. Y., Green F. A. // J. Membrane Biol. 1978. V. 39. № 2–3. P. 273–284.
6. Hanpft R., Mohr K. // Biochim. et biophys. acta. 1985. V. 814. № 1. P. 156–162.
7. Sekiya T., Nozawa Y. // Cell Structure and Function. 1983. V. 8. № 2. P. 185–191.
8. Lieber M. R., Steck T. L. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 19. P. 11651–11659.
9. Lieber M. R., Steck T. L. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 19. P. 11660–11679.
10. Minetti M., Ceccarini M., Di Stasi A. M. M. // J. Cell. Biochem. 1984. V. 25. № 2. P. 73–86.
11. Plishker G. A. // Cell Calcium. 1984. V. 5. № 2. P. 177–190.
12. Lee A. G. // Biochim. et biophys. acta. 1978. V. 514. № 1. P. 95–104.
13. Johnson R. M. // J. Membrane Biol. 1975. V. 22. № 3–4. P. 231–253.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР, Харьков,

Поступила в редакцию
28.09.90
После доработки
22.05.91

**EFFECT OF CHLORPROMAZINE ON THERMAL AND OSMOTIC
SENSITIVITY OF ERYTHROCYTES**

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine,
Ukrainian SSR Academy of Sciences, Khar'kov*

Key words: chlorpromazine, erythrocyte hemolysis, cold shock.

The effect of chlorpromazine on the development of cold shock in erythrocytes exposed to sodium chloride was shown to depend on the tonicity of the medium in which the cells were cooled from 37° C down to 0° C as well as on the amphipate concentration. After cooling of erythrocytes in a NaCl (0.75–1.5 M)-containing medium with chlorpromazine (7×10^{-5} M, 2.1×10^{-4} M and 3.5×10^{-4} M) the hypertonic cold shock was inhibited, the protective effect of the amphipate being less pronounced at its increasing concentrations. After cooling of cells under conditions of moderate hypertonicity (0.3–0.6 M NaCl) no modifying effect of chlorpromazine on the sensitivity of erythrocytes to the temperature decrease from 37° C down to 0° C was manifested. However, under iso- and hypertonic conditions chlorpromazine used at 2.1×10^{-4} M and 3.5×10^{-4} M stimulated the cold shock development in erythrocytes. A sharp increase in the medium tonicity (up to 1.8–3.0 M and higher) the cells underwent isothermal hemolysis which was more expressed at 0° C than at 37° C. These data suggest that chlorpromazine significantly activates the hemolytic process at low temperatures.