БИОФИЗИКА, 2019, том 64, № 3, с. 478–485

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 577.352.4:612.111.019:57.086.13

КОРРЕКЦИЯ ХОЛОДОВОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ХЛОРПРОМАЗИНОМ, ВЛИЯЮЩИМ НА ДИНАМИЧЕСКУЮ СТРУКТУРУ МЕМБРАН

© 2019 г. Н.М. Шпакова, Н.В. Орлова, С.С. Ершов

Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины, 61016, Харьков, ул. Переяславская, 23, Украина

E-mail: starling.nataly@gmail.com

Поступила в редакцию 18.07.2018 г.
После доработки 18.03.2019 г.
Принята к публикации 28.03.2019 г.

Исследована устойчивость эритроцитов млекопитающих (человек, собака, лошадь, бык и кролик) к холодовому шоку в присутствии хлорпромазина и изучено его влияние на состояние эритроцитарных мембран. С помощью корреляционного анализа определена сила связи между мембранными фосфолипидами эритроцитов млекопитающих и характеристиками холодового шока этих клеток. Установлено, что более устойчивыми к холодовому шоку являются эритроциты млекопитающих, мембраны которых характеризуются высоким содержанием сфингомиелина, фосфатидилэтаноламина и низким содержанием фосфатидилхолинов. Показана высокая эффективность хлорпромазина в защите эритроцитов млекопитающих от холодового шока. Методом ЭПР спиновых зондов исследована динамическая структура мембран эритроцитов человека, обработанных хлорпромазином. Использование набора спин-меченых зондов: амида пальмитиновой кислоты, 5-доксилстеариновой кислоты и 16-доксилстеариновой кислоты, позволяющих изучать параметры микровязкости липидного бислоя мембран эритроцитов в трансмембранном направлении, позволило установить локализацию действия хлорпромазина: в области полярных головок и гидрофобных хвостов мембранных фосфолипидов.

Ключевые слова: эритроциты млекопитающих, холодовой шок, хлорпромазин, антигемолитическая активность, структурно-динамическое состояние мембран.

DOI: 10.1134/S0006302919030074

Низкотемпературное консервирование широко используется для продолжительного хранения биологического материала. При температуре –196°С биологический объект может храниться достаточно долго. Основные его повреждения развиваются при замораживании, когда происходит изменение температуры и концентрирование внеклеточного раствора в результате вымораживания свободной воды. Для моделирования действия факторов криоповреждения (в частности, изменения температуры) на клетки используют холодовой шок, который заключается в их охлаждении от 37°С до 0°С [1,2]. В указанных условиях многие клетки повреждаются, в отличие от эритроцитов человека, которые достаточно устойчивы к охлаждению. Поэтому с целью сенсибилизации эритроцитов к охлаждению используют гипертонические растворы. Необходимость применения гипертонических растворов в случае холодового шока эритроцитов человека связывают с присутствием холестерина в их плазматических мембранах [1,2]. Полагают, что развитие повреждения эритроцитов человека при холодовом шоке происходит следующим образом. В условиях инкубирования клеток в гипертонической среде (при 37°С) в результате обезвоживания развивается латеральное разделение мембранных компонентов. В процессе последующего охлаждения этих клеток до 0°С происходят фазовые переходы липидов в бесхолестериновых областях эритроцитарной мембраны. На границе раздела фаз образуются дефекты, через которые происходит утечка внутриклеточного содержимого. Представленная точка зрения развития холодового шока эритроцитов человека базируется на данных, полученных с использованием модельных систем [3–5] и при истощении клеточных мембран по холестерину [6,7]. Последний подход,

Сокращения: ХПР – хлорпромазин, АПК – амид пальмитиновой кислоты, 5-ДС – 5-доксилстеариновая кислота, 16-ДС – 16-доксилстеариновая кислота.

связанный с направленной модификацией структурных компонентов клетки, может приводить к изменениям, которые не являются узкоспецифичными и охватывают клетку в целом, т.е. вызывают нарушения ее нативности в той или иной степени. В связи с этим для исследования температурной и осмотической чувствительности клеток целесообразно использовать нативные эритроциты разных видов млекопитающих, которые различаются по составу цитоплазмы, способности к деформации, активности транспортных путей, фосфолипидному и белковому составу мембраны [8–12]. Использование таких природных биологических объектов с привлечением корреляционного анализа является перспективным для выявления компонентов, участвующих в механизме реализации устойчивости клеток к действию стресса.

Известно, что разрушение эритроцитов человека в условиях холодового шока могут предотвращать амфифильные соединения, в частности хлорпромазин (ХПР) [13,14]. В настоящее время интерес к ХПР, который является классическим транквилизатором и используется при лечении определенных психических расстройств, обусловлен его противомикробными и противоопухолевыми свойствами [15–18].

Эффект ХПР в условиях температурно-осмотического стресса эритроцитов реализуется в первую очередь на уровне плазматической мембраны. В пользу этого свидетельствуют и данные о трансформации клеток под действием этого вещества [19]. Можно полагать, что проявление антигемолитического эффекта будет определяться структурно-динамическим состоянием эритроцитарной мембраны.

Целью данной работы является исследование особенности устойчивости эритроцитов разных видов млекопитающих (человек, собака, лошадь, бык и кролик) к действию холодового шока в присутствии хлорпромазина и изучение влияния этого вещества на структурно-динамическое состояние эритроцитарных мембран.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение эритроцитов млекопитающих. Для исследования использовали эритроциты, полученные из донорской крови человека, быка, лошади, собаки и кролика, заготовленной на гемоконсерванте «Глюгицир». Кровь мужчин группы А(II)+ была предоставлена Харьковским областным центром службы крови. Кровь быка, лошади и собаки была предоставлена Харьковской государственной зооветеринарной академией, кролика – виварием Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.

В качестве доноров крови были использованы здоровые половозрелые самцы животных, которые были иммунизированы, свободны от паразитов. Заготовку крови животных и все манипуляции проводили в соответствии с отечественными и международными биоэтическими нормами, материалами IV Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (ETS 123) (Страсбург, 1986).

После удаления плазмы эритромассу трижды отмывали путем центрифугирования (центрифуга ОПн-3У4.2, 3000 об/мин, 3 мин) в 10-кратном объеме физиологического раствора (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатный буфер, pH 7,4). Лейкоцитарную пленку и супернатант удаляли аспирацией. Эритроциты хранили в виде плотного осадка не более четырех часов при температуре 0°C. Все используемые в работе среды готовили на 0,01 моль/л фосфатном буфере, pH 7,4

Холодовой шок эритроцитов осуществляли следующим образом: сначала 50 мкл клеточного осадка переносили на 10 мин при температуре 37°C в 0,5 мл раствора, содержащего разные концентрации NaCl (0,15–2,00 моль/л); затем из этой пробы 50 мкл суспензии эритроцитов переносили на 10 мин в 1,0 мл раствора NaCl той же концентрации, охлажденного до температуры 0°C. Конечный гематокрит – 0,4%. Точность измерения температуры ± 0,5°C.

Контроль осмоляльности растворов осуществляли с помощью осмометра ОМКА 1Ц-01 (Одесса, Украина).

Вычисление значений максимальной антигемолитической активности и эффективных концентраций хлорпромазина. Были получены зависимости гемолиза эритроцитов млекопитающих в условиях холодового шока от концентрации ХПР (10–340 мкмоль/л). Клетки переносили из гипертонической среды (1,2 моль/л NaCl, 37°C, 10 мин) в охлажденный раствор (1,2 моль/л NaCl, 0°C, 10 мин), уже содержащий ХПР.

Из полученных концентрационных зависимостей гемолиза эритроцитов млекопитающих в условиях холодового шока были рассчитаны величины максимальной антигемолитической активности и значения эффективных концентраций.

Эффективная концентрация ($C_{AI\max}$) ХПР соответствовала середине диапазона концентраций вещества, в пределах которого наблюдался минимальный уровень гемолиза эритроцитов.

Значение максимальной антигемолитической активности ($AI_{\max}$) ХПР рассчитывали по формуле:

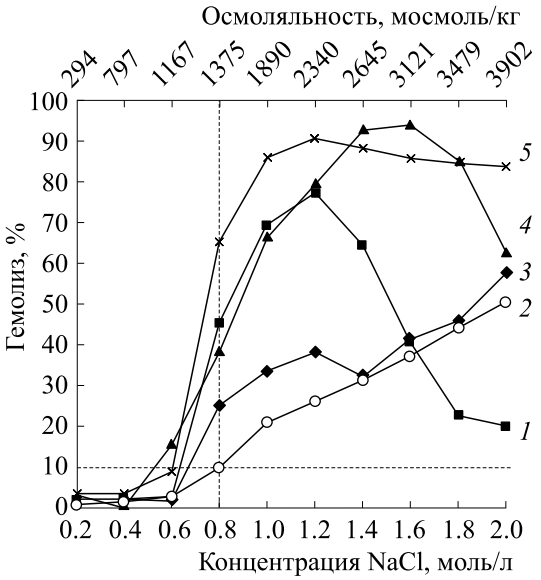


Рис. 1. Зависимости уровня гемолиза эритроцитов млекопитающих в условиях холодового шока от концентрации NaCl в среде: *1* – человек, *2* – кролик, *3* – бык, *4* – лошадь, *5* – собака.

$$A\Gamma_{\max} = \frac{\kappa - a}{\kappa} \times 100\ \%,$$

где κ – величина гемолиза эритроцитов в отсутствие ХПР, a – минимальная величина гемолиза эритроцитов в присутствии ХПР.

Концентрация хлорпромазина в стоковом растворе составляла 40 ммоль/л.

Определение уровня гемолиза эритроцитов методом спектрофотометрии. Клетки осаждали центрифугированием в течение 3 мин при 3000 об/мин. Содержание вышедшего в супернатант гемоглобина определяли спектрофотометрическим способом на спектрофотометре СФ-4А («ЛОМО», Россия) с проточной кюветой при длине волны 543 нм и выражали в процентах по отношению к 100%-му гемолизу эритроцитов. За 100% принимали поглощение пробы, в которую добавляли тритон X-100 в концентрации 0,1%.

Исследование состояния липидного бислоя мембран эритроцитов методом ЭПР-спектроскопии. Структурно-динамическое состояние мембран эритроцитов человека исследовали методом ЭПР спиновых зондов с помощью спин-меченых жирных кислот, содержащих нитроксильные фрагменты в различных положениях вдоль гидрофобной цепи – амида пальмитиновой кислоты (АПК), 5-доксилстеариновой кислоты (5-ДС) и 16-доксилстеариновой кислоты (16-ДС).

Эритроциты человека, выделенные по стандартной методике, инкубировали с ХПР (120 мкмоль/л) в среде, содержащей 150 ммоль/л NaCl, 10 ммоль/л фосфатный буфер (pH 7,4), при температуре 37°C в течение 10 мин. Инкубация клеток с амфифильным веществом не сопровождалась гемолизом эритроцитов. Контрольные клетки инкубировали в аналогичных условиях без добавления ХПР. К контрольным или модифицированным ХПР клеткам добавляли раствор зондов. Спин-меченая суспензия эритроцитов (порядка 10^9 кл/мл) содержала $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л зонда (не более 2% спирта). Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре «Bruker» со стандартной термоприставкой при 37°C. Параметры вращательной подвижности зондов вычисляли, как описано в работе [20].

Статистический анализ данных. Статистическую обработку полученных числовых материалов и все виды анализа результатов проводили с помощью программы «Statistica» (версия 6.0). Экспериментальные данные представлены как среднее арифметическое значение количественных показателей (M) ± стандартная ошибка среднего арифметического (m) или как медиана результатов (Me) и степень рассеяния в виде интерквартильного интервала (Q1–Q3). Для проверки статистической значимости различий применяли критерии Манна–Уитни. Корреляционный анализ с использованием непараметрического коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r_s) применяли для анализа связей между исследуемыми показателями. Различия считали статистически значимыми при $p < 0{,}05$.

Реактивы. В работе использовали следующие реактивы: 5-доксилстеариновую кислоту, 16-доксилстеариновую кислоту, хлорпромазин гидрохлорид (Calbiochem, США), амид пальмитиновой кислоты (Reanal, Венгрия); тритон X-100 (Merck, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены данные о развитии гемолиза эритроцитов млекопитающих при охлаждении от 37°C до 0°C в гипертонических средах. Монотонные зависимости гемолиза эритроцитов быка и кролика от концентрации соли в инкубационной среде при охлаждении от 37°C до 0°C существенно отличаются от зависимостей, полученных для эритроцитов человека, собаки и лошади (рис. 1). Последние характеризуются постепенным повышением уровня повреждения с последующим в большей или меньшей степени выраженным снижением, которое можно объяснить некой «адаптацией» клеток к холодовому шоку. В основе отмеченной «адаптации» эритроцитов человека, лошади и собаки могут лежать процессы, связанные с входом катионов Na^+ в клетки, что будет приводить к снижению концен-

трационного градиента на мембране и, как следствие, к уменьшению уровня гемолитического повреждения эритроцитов при охлаждении.

Поскольку развитие повреждения эритроцитов человека в условиях холодового шока связывают с фазовыми переходами липидов в бесхолестериновых областях эритроцитарной мембраны и формированием дефектов на границе раздела фаз [1,2], представляло интерес оценить содержание холестерина в мембранах изучаемых эритроцитов. Проведенный анализ показал, что для клеток человека, собаки, быка, кролика и лошади содержание мембранного холестерина варьирует в диапазоне от 23,0 до 29,9% от общих фосфолипидов [21,22], причем этот показатель оказался выше в клетках, которые более устойчивы к действию холодового шока – эритроцитах быка и кролика.

Это согласуется с ранее выдвинутыми предположениями о важной роли холестерина в развитии холодового повреждения эритроцитов человека и распространяется на клетки животных.

Исходя из важности липидного компонента эритроцитарной мембраны в обеспечении устойчивости клеток к действию холодового шока [1,2], представляло интерес оценить силу корреляционной связи между мембранными фосфолипидами эритроцитов разных видов млекопитающих и характеристиками холодового шока этих клеток (рис. 1).

В качестве показателей холодового шока эритроцитов использовали два параметра, которые определяли из концентрационных зависимостей гемолиза эритроцитов млекопитающих (рис. 1) – это значение пороговой концентрации NaCl (т.е. максимальная концентрация соли, после которой наблюдается увеличение уровня гемолиза клеток, превышающее 10%) и величину гемолиза в среде, содержащей 0,8 моль/л NaCl. Данные по фосфолипидному составу (в процентах от общего количества фосфолипидов) эритроцитарных мембран разных видов млекопитающих взяты из работы [21]. Результаты корреляционного анализа представлены в табл. 1. Видно, что пороговые концентрации соли положительно коррелируют с содержанием сфингомиелина и фосфатидилэтаноламина и отрицательно – с содержанием фосфатидилхолина в различных комбинациях.

Уровень гемолиза эритроцитов в 0,8 моль/л NaCl положительно коррелирует с холинсодержащими фосфолипидами и отрицательно – с содержанием фосфатидилэтаноламина. Таким образом, эритроциты, которые характеризуются высоким содержанием фосфатидилэтаноламина и низким содержанием фосфатидилхолина, то есть клетки быка и кролика, являются более устойчивыми к повреждающему действия холодового шока.

Таблица 1. Корреляция между показателями холодового шока эритроцитов млекопитающих и липидным составом их плазматических мембран [21]

Липиды мембран эритроцитов	Пороговые концентрации NaCl, моль/л		Гемолиз в 0,8 моль/л NaCl, %	
	r_s	p	r_s	p
Лизофосфатидилхолин	−0,891*	0,017	0,609	0,200
Сфингомиелин	0,878*	0,021	−0,714	0,111
Фосфатидилхолин	−0,878*	0,021	0,657	0,156
Сфингомиелин + + фосфатидилхолин	−0,878*	0,021	0,829*	0,042
Лизофосфатидилхолин + + сфингомиелин + + фосфатидилхолин	−0,878*	0,021	0,829*	0,042
Фосфатидилэтаноламин	0,878*	0,021	−0,886*	0,019
Сфингозин	0,878*	0,021	−0,714	0,111

Примечание. * – Статистически значимые корреляции ($p < 0,05$).

В ранее предложенном механизме холодового шока авторы работы [23] связывали повреждение клеток при охлаждении с содержанием неламеллярного фосфатидилэтаноламина, полагая, что этот фосфолипид участвует в формировании трансмембранных дефектов, приводящих к развитию гемолиза эритроцитов. Однако полученные нами результаты (табл. 1, рис. 1) указывают на иную роль неламеллярных фосфолипидов в развитии холодового шока эритроцитов млекопитающих, поскольку связь между содержанием фосфатидилэтаноламина, сфингомиелина и значением пороговых концентраций соли значимая и положительная, а между содержанием фосфатидилэтаноламина и величиной гемолиза в 0,8 моль/л NaCl – значимая и отрицательная. Таким образом, неламеллярные фосфолипиды, наоборот, обеспечивают устойчивость клеток к холодовому шоку, вероятно, за счет образования гексагональной структуры в ламеллярной упаковке липидов. В результате этого происходит сброс напряжения на мембране (значительное изотропное натяжение жидких липидных участков мембраны при охлаждении) и, как следствие, большие трансмембранные поры, доступные для внутриклеточных молекул гемоглобина, не могут формироваться.

Таблица 2. Величины максимальной антигемолитической активности и значения эффективных концентраций хлорпромазина при холодовом шоке эритроцитов млекопитающих в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl

Эритроциты млекопитающих	АГмакс, %	$C_{АГмакс.}$, мкмоль/л
Человек	70 ± 3	120 ± 20
Бык	70 ± 4	155 ± 5
Лошадь	76 ± 2	240 ± 7
Кролик	70 ± 3	145 ± 10
Собака	44 ±9	82 ± 21

Примечание. $АГ_{max}$ – антигемолитическая активность; $C_{АГmax}$ – значения эффективных концентраций хлорпромазина; представлены данные $M \pm m$, $n = 7$.

Фосфатидилэтаноламин и холестерин являются эндогенными факторами, определяющими устойчивость эритроцитов разных видов млекопитающих к холодовому шоку. Поскольку на формирование трансмембранных пор могут оказывать влияние не только эндогенные, но и экзогенные факторы, представляло интерес исследовать влияние мембранотропного агента ХПР на чувствительность эритроцитов животных к холодовому шоку. Поскольку эритроциты млекопитающих различаются по липидному составу плазматических мембран [21,22], можно предположить, что в условиях холодового шока эффективность ХПР будет определяться видовыми особенностями клеток.

Проведенные исследования позволили выявить защитный эффект ХПР в условиях холодового шока для клеток всех исследуемых животных (табл. 2). Уровень антигемолитической активности хлорпромазина достаточно высокий для эритроцитов человека, лошади, быка и кролика (порядка 70%) и несколько ниже для клеток собаки (44%). Выявленная особенность эффективности ХПР для эритроцитов собаки может быть связана с невысоким содержанием мембранного фосфатидилэтаноламина по сравнению с эритроцитами других млекопитающих [21] и, как следствие, низкой способностью клеток собаки адаптироваться к изменяющимся температурно-осмотическим условиям внешней среды.

Молекулярный механизм антигемолитического действия ХПР в условиях холодового шока недостаточно изучен.

ХПР характеризуется множественным влиянием на биологические объекты. Его действие на клетки проявляется как на макроуровне (в изменении формы эритроцитов [19,24]), так и на микроуровне. В последнем случае изменения, вызванные действием ХПР, затрагивают как непосредственно саму эритроцитарную мембрану, так и метаболический статус клетки. Известно, что ХПР является ингибитором кальмодулина [25,26], цитоплазматического белка, участвующего в формировании клеточного ответа на внешние воздействия [27–29].

Изучение эффективности ХПР при его использовании на разных этапах температурно-осмотического стресса эритроцитов человека показало, что предобработка эритроцитов ХПР не позволяет веществу проявить антигемолитический эффект [13,30]. Это свидетельствует о том, что антигемолитическое действие ХПР не связано с предварительной биохимической модификацией клеток, которая заключается в первую очередь в ингибировании кальмодулина. Тот факт, что для проявления эффективности ХПР в условиях холодового шока эритроцитов необходимо его присутствие в среде в момент резкого изменения температурных условий (37°C – 0°C), говорит о способности ХПР встраиваться и инициировать в мембране процессы, предотвращающие ее разрушение. Ранее в работе [31] с использованием эритроцитарных теней была показана способность ХПР влиять на замыкание мембранных пор.

Амфифильные соединения взаимодействуют как с липидными, так и с белковыми компонентами мембраны [32–34]. В работе с использованием катионного трифторперазина [35] показано, что в условиях осмотического шока эритроцитов человека эффективность вещества не зависит от состояния белковых компонентов мембраны, модифицированных протеолитическими ферментами (проназа, трипсин, папаин) и нейраминидазой. Исходя из этого, можно предположить, что мишенью действия амфифильных соединений являются в первую очередь липидные компоненты мембраны. Хлорпромазин, являющийся катионным амфифильным соединением, преимущественно взаимодействует с отрицательно заряженными липидами, что показано с использованием модельных объектов [36,37].

Методом ЭПР-спектроскопии с использованием спиновых зондов была исследована динамическая структура мембраны эритроцитов человека в присутствии ХПР. Для этого применяли набор зондов, с помощью которых изучали параметры микровязкости липидного бислоя мембран эритроцитов в трансмембранном направлении. Спин-меченые жирные кислоты (амид пальмитиновой кислоты, 5-доксилстеариновая и 16-доксилстеариновая кислоты) содержали нитроксильные фрагменты в различных положениях

вдоль гидрофобной цепи. Зонд АПК, меченный в первом положении вдоль углеродной цепи, является удобным инструментом для изучения состояния полярной поверхности мембраны. Зонды 5-ДС дают информацию о структуре гидратированной анизотропной зоны мембраны, а 16-ДС – более гидрофобной области (удаленной от поверхности мембраны на расстояние около 20 Å).

Типичные спектры ЭПР зондов АПК, 5-ДС и 16-ДС в мембране эритроцитов при 20°С представлены на рис. 2. Спектры зондов АПК и 16-ДС свидетельствуют о сравнительно быстром вращении нитроксилов на поверхности и в гидрофобной зоне бислоя, соответственно, в то время как спектр зонда 5-ДС отражает существенно анизотропное вращение радикала. Кроме того, спектр зонда 16-ДС демонстрирует суперпозицию сигналов в высоком поле (наложение сигналов от зондов, находящихся в различных микроокружениях), что свидетельствует о локализации нитроксилов в микроокружениях с различной полярностью. Параметр перераспределения зонда в этих микрообластях, вычисляемый по отношению интенсивностей «гидрофобного» и «полярного» сигналов (I_h/I_p, рис. 2) может служить характеристикой динамической структуры мембраны. При использовании одинаковых концентраций эритроцитов во всех экспериментах эмпирический параметр встраивания (диффузии) зонда в мембрану, пропорциональный интенсивности «гидрофобного» сигнала ЭПР, зависит от состояния липидных областей, сорбирующих молекулы зонда.

Обработку эритроцитов человека хлорпромазином осуществляли инкубированием клеток в физиологическом растворе, содержащем амфифил, при температуре 37°С. Продолжительность инкубирования клеток с ХПР в течение 10 мин как в экспериментах с ЭПР, так и в случае холодового шока эритроцитов достаточна для полного встраивания амфифильных молекул в мембрану [38]. Концентрация вещества соответствовала эффективной концентрации ХПР при холодовом шоке эритроцитов человека (табл. 2) с учетом гематокрита и, как показано в работе [39], не вызывала нарушения барьерной функции мембраны для ионов феррицианида.

В табл. 3 представлены значения параметров зондов АПК, 5-ДС и 16-ДС в мембранах эритроцитов, обработанных ХПР. Исследование влияния ХПР на липидный бислой мембран с использованием зонда АПК показало, что ХПР значительно уменьшает частоту вращательной подвижности спинового зонда, что свидетельствует об увеличении микровязкости водно-липидной поверхности мембраны. Значение параметра ΔH_0, соответствующее частоте вращения

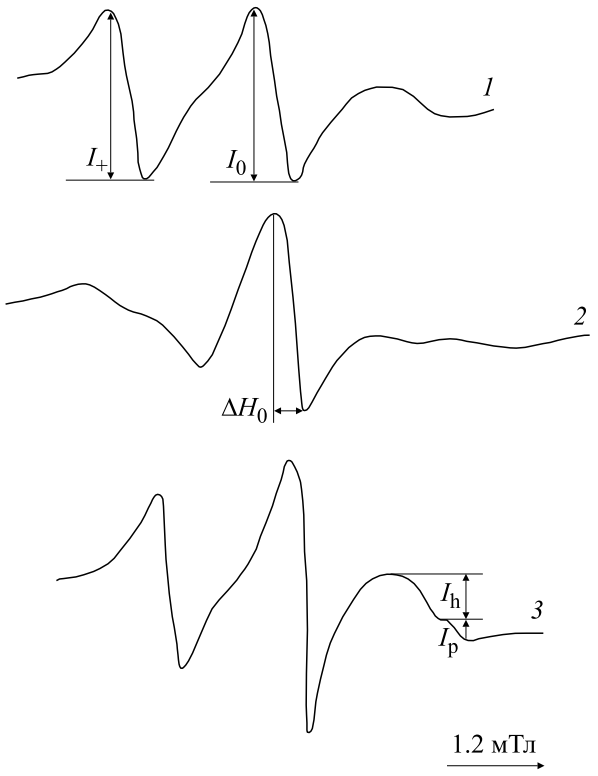


Рис. 2. Спектры ЭПР спин-меченых жирных кислот в мембране эритроцитов человека: *1* – амид пальмитиновой кислоты, *2* – 5-доксилстеариновая кислота, *3* – 16-доксилстеариновая кислота.

нитроксильного радикала зонда 5-ДС, не изменяется для эритроцитов, проинкубированных с ХПР, т.е. ХПР не оказывает влияние на состояние

Таблица 3. Параметры вращательной подвижности зондов АПК и 16-ДС (ν_+), зонда 5-ДС (ΔH_o) и параметр распределения зонда 16-ДС (I_h/I_p) в мембране эритроцитов человека, обработанных хлорпромазином (Me, Q1–Q3)

Зонд	Параметр	Контроль	Хлорпромазин
АПК	$\nu_+ \times 10^{-8}$, c^{-1}	7,92 (7,65–8,32)	6,02* (5,61–7,00)
5-ДС	ΔH_o, G	3,51 (3,32–3,85)	3,64 (3,35–4,25)
16-ДС	I_h/I_p	3,0 (2,2–3,7)	4,6* (3,4–5,0)
	$\nu_+ \times 10^{-8}$, c^{-1}	4,98 (4,40–5,93)	3,38* (3,06–4,12)

Примечание. * – статистически значимые различия по сравнению с показателями контрольных клеток ($p < 0,05$); $n = 7$.

анизотропной зоны мембраны (область глицериновых остатков молекул фосфолипидов).

Величина частоты вращательной подвижности нитроксильного радикала зонда 16-ДС (табл. 3) свидетельствует о повышении микровязкости гидрофобной зоны мембраны под действием ХПР. При исследовании влияния ХПР на перераспределение молекул зонда 16-ДС (I_h/I_p) в бислое мембран эритроцитов (табл. 3) обнаружено практически полное исчезновение сигнала от зонда в полярном микроокружении. Выявленные особенности влияния ХПР на гидрофобные области мембраны могут быть связаны со способностью этого вещества при встраивании в мембрану пересекать ее и распределяться во внутреннем монослое [19].

Таким образом, показана способность ХПР изменять структурно-динамическое состояние эритроцитарной мембраны, что отражает неспецифическое нарушение баланса гидрофильно-гидрофобных взаимодействий и, как результат, возможное изменение упаковки липидов в латеральном и трансмембранном направлениях.

Следует отметить, что наши результаты об увеличении микровязкости как водно-липидной поверхности мембраны, так и гидрофобной зоны мембраны (табл. 3) согласуются с данными, полученными другими исследователями [32,40]. Так, было показано, что в модельных бислоях ХПР увеличивает упорядоченность фосфолипидов, изменяя их состояние в области полярных головок и жирнокислотных цепей [40], причем эти эффекты могут быть обратимыми [32].

В заключение можно сделать вывод о том, что развитие холодового шока эритроцитов млекопитающих зависит от липидного состава их плазматических мембран, в частности, более устойчивыми являются клетки с высоким содержанием холестерина и неламеллярных фосфолипидов (фосфатидилэтаноламина и сфингомиелина). Хлорпромазин, характеризующийся высоким коэффициентом распределения в эритроцитарной мембране, защищает эритроциты всех исследуемых млекопитающих от холодового повреждения. В присутствии ХПР происходит изменение микровязкости мембраны в области полярных головок и гидрофобных хвостов мембранных фосфолипидов. Можно предположить, что в основе защитного действия ХПР при холодовом шоке эритроцитов лежит способность его молекул предотвращать образование трансмембранных пор через изменение состояния липидных компонентов мембраны.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. М. Белоус, Е. А. Гордиенко и Л. Ф. Розанов, *Замораживание и криопротекция* (Высш. шк., М., 1987).
2. А. М. Белоус и В. И. Грищенко, *Криобиология* (Наук. думка, Киев, 1994).
3. H. Giang and M. Schick, Chem. Phys. Lipids **199**, 35 (2016).
4. L. Mao, L. Yang, Q. Zhang, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. **468** (1–2), 125 (2015).
5. Y. Lange, S. M. Ali Tabei, J. Ye, et al., Biochemistry **52** (40), 6950 (2013).
6. W. F. Wolkers, L M. Crowe, N. M. Tsvetkova, et al., Mol. Membr. Biol. **19** (1), 59 (2002).
7. M. B. Cassera, A. M. Silber, and A. M. Gennaro, Biophys. Chem. **99** (2), 117 (2002).
8. J. Florin-Christensen, C. E. Suarez, M. Florin-Christensen, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98** (14), 7736 (2001).
9. G. Benga, Eur. Biophys. J. **42** (1), 33 (2013).
10. L. Liu, T. Lei, L. Bankir, et al., J. Comp. Physiol. B **181** (1), 65 (2011).
11. H. Matei, L. Frentescu, and Gh. Benga, J. Cell. Mol. Med. **4** (4), 270 (2000).
12. P. Bogner, K. Sipos, A. Ludany, et al., Eur. Biophys. J. **31** (2), 145 (2002).
13. Н. М. Шпакова, Е. Р. Панталер и В. А. Бондаренко, Биохимия **60** (10), 1624 (1995).
14. Н. М. Шпакова, Проблемы криобиологии **19** (4), 449 (2009).
15. T. Alexandru, A. Staicu, A. Pascu, et al., J. Biomed. Opt. **20** (5), 051002 (2015).
16. A. M. Armada, T. Alexandru, D. Machado, et al., In Vivo **27** (5), 605 (2013).
17. W. Y. Lee, W.T. Lee, C.H. Cheng, et al., Oncotarget **6** (29), 27580 (2015).
18. D. Rundle-Thiele, R. Head, L. Cosgrove, et al., Br. J. Clin. Pharmacol. **81** (2), 199 (2016).
19. H. Ahyayaucha, M. Gallego, O. Casis, et al., J. Physiol. Biochem. **62** (3), 199 (2006).
20. Г. И. Лихтенштейн, Метод спиновых меток в молекулярной биологии (Наука, М., 1974).
21. J. M. C. Wessels and J. H. Veerkamp, Biochim. Biophys. Acta **291** (1), 190 (1973).
22. G. J. Nelson, J. Lipid Res. **8** (4), 374 (1967).
23. А. М. Белоус, В. А. Бондаренко, Т. П. Бондаренко и др., Криобиология и криомедицина **12**, 13 (1983).
24. W. H. Reinhart, S. Lubszky, S. Thöny, et al., Toxicol. In Vitro **28** (7), 1274 (2014).
25. H. Kawamura, M. Arai, and A. Togari., Pharmacol. Sci. **117** (1), 54 (2011).
26. C. Lübker and R .Seifert, PLoS One **10** (5), e0124017 (2015).
27. E. Carafoli and J. Krebs, J. Biol. Chem. **291** (40), 20849 (2016).
28. A. Roy, J. Ye, F. Deng, et al., Biochim. Biophys. Acta **1868** (1), 283 (2017).
29. S. Takemoto-Kimura, K. Suzuki, S. I. Horigane, et al., J. Neurochem. **141** (6), 808 (2017).

30. E. A. Semionova, E. A. Chabanenko, N. V. Orlova, et al., Probl. Cryobiol. Cryomed. **27** (3), 219 (2017).

31. M. R. Lieber and T. L. Steck, J. Biol. Chem. **257** (19), 11660 (1982).

32. Y. W.Jiang, G. Gao, Z. Chen, et al., New J. Chem. **41** (10), 4048 (2017).

33. E. A. Guevara, M. de Lourdes Barriviera, A. Hassón-Voloch, et al., Photochem. Photobiol. **83** (4), 914 (2007).

34. P. T. Martins, A. Velazquez-Campoy, W. L. Vaz, et al., J. Am. Chem. Soc. **134** (9), 4184 (2012).

35. Н. М. Шпакова, О. Н. Дунаевская, О. П. Сынчикова и др., Проблемы криобиологии **3**, 7 (2002).

36. A. V. Agasøster, L. M. Tungodden, D. Čejka, et al., Biochem. Pharmacol. **61** (7), 817 (2001).

37. J. Y. Chen, L. S. Brunauer, F. C. Chu, et al., Biochim. Biophys. Acta **1616** (1), 95 (2003).

38. J. Y. Chen and W. H. Huestis, Biochim. Biophys. Acta **1323** (2), 299 (1997).

39. 39. Л. В. Цымбал, Н. В. Орлова и Н. М. Шпакова, Биол. мембраны **22** (4), 327 (2005).

40. M. Suwalsky, F. Villena, C. P. Sotomayor, et al., Biophys. Chem. **135** (1–3), 7 (2008).

Correction of Cold Injury to Mammalian Erythrocytes by Chlorpromazine, Influencing the Membrane Dynamic Structure

N.M. Shpakova, N.V. Orlova, and S.S. Yershov

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine
ul. Pereyaslavska 23, Kharkiv, 61016 Ukraine

The stability of mammalian erythrocytes (human, dog, horse, bull and rabbit) to cold shock in the presence of chlorpromazine was studied and its effect on the state of erythrocyte membranes was investigated. By means of the correlation analysis, the force of the connection between membrane phospholipids of mammalian erythrocytes and the characteristics of the cold shock of these cells was determined. It has been established that erythrocytes of mammals whose membranes are characterized with a high content of sphingomyelin, phosphatidylethanolamine and a low content of phosphatidylcholines are more resistant to the cold shock. The chlorpromazine shows the high efficiency when protecting mammalian erythrocytes against the cold shock. The dynamic structure of membranes of human erythrocytes treated with the chlorpromazine was studied by EPR of spin probes. The use of a set of spin-labeled probes: palmitic acid amide, 5-doxylstearic acid and 16-doxylstearic acid, which allow studying the microviscosity parameters of the lipid bilayer of erythrocyte membranes in the transmembrane direction, has made it possible to establish the localization of the action of the chlorpromazine, namely in the region of polar heads and hydrophobic tails of membrane phospholipids.

Keywords: mammalian erythrocytes, cold shock, chlorpromazine, anti-hemolytic activity, structural and dynamic state of membranes